

NACHWEIS EINER INHIBITORISCHEN WIRKUNG
VON LIPOPOLYSACCHARIDEN AUF GEREINIGTE
KOMPLEMENTKOMPONENTEN UND
CHARAKTERISIERUNG DIESES HEMMEFFEKTES
AM BEISPIEL DES C3

von
Horst Ulrich Beuscher
aus
Göttingen

1984

Diss. Erlangen

1984 #319



Digitized by the Internet Archive
in 2026

NACHWEIS EINER INHIBITORISCHEN WIRKUNG
VON LIPOPOLYSACCHARIDEN AUF GEREINIGTE
KOMPLEMENTKOMPONENTEN UND
CHARAKTERISIERUNG DIESES HEMMEFFEKTES
AM BEISPIEL DES C3

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Horst Ulrich Beuscher

aus

Göttingen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Mai 1984

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatte: Professor Dr. V. Brade

Zweitberichterstatte: Professor Dr. W. Heumann

Meinen Eltern zum Gedenken.

1. Gedächtnisrede

2. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen

3. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

4. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

5. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

6. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

7. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

8. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

9. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

10. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

11. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

12. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

13. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

14. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

15. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

16. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

17. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

18. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

19. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

20. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

Meinen Eltern zum Gedenken.

21. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

22. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

23. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

24. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

25. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

26. Gedächtnisrede von dem Verstorbenen, die dem Verstorbenen
selbst zugeordnet ist

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	EINLEITUNG	1
II.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	14
1.	<u>Reinigung der Komplementkomponenten C3 und C5 aus Meerschweinchenserum</u>	14
1.1.	Polyethylenglycol (PEG) - Fraktionierung für die Fällung von C3 und C5	14
1.2.	Affinitätschromatographie mit Lysin-Sephacrose 4 B für die Abtrennung von Plasminogen	16
1.3.	Anionenaustauscherchromatographie von C3 und C5 mit DEAE-Sephacel	18
1.4.	Kationenaustauscherchromatographie für C3 mit SP-Sephadex C 50	19
1.5.	Gelchromatographie für C3 mit Sephacryl S 300	20
1.6.	Reinheitsanalyse des isolierten C3	21
1.6.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	21
1.6.2.	Immunoelektrophorese	23
1.7.	Zusammenfassende Darstellung einer C3-Reinigung aus Meerschweinchenserum	24
1.8.	Gelfiltration von C5 an Sephacryl S 300	26
1.9.	Adsorptionschromatographie von C5 an Hydroxylapatit	27
1.10.	Anionenaustauscherchromatographie von C5	27
1.11.	Reinheitsanalyse des isolierten C5	29
1.11.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
1.11.2.	Immunoelektrophorese	30
1.12.	Zusammenfassende Darstellung einer Reinigung von C5 aus Meerschweinchenserum	32
2.	<u>Charakterisierung von gereinigtem C3 und C5</u>	34
2.1.	Molekulargewichte von C3 und C5 in der Dichtegradientenzentrifugation	34
2.2.	Molekulargewichte von C3 und C5 in der Gelfiltration	36
2.3.	Charakterisierung der Untereinheiten von C3 und C5 in der Natriumdodecylsulfat (SDS) - Gelelektrophorese	38

	Seite
2.3.1. Untereinheiten von C3	39
2.3.2. Untereinheiten von C5	43
3. <u>Hemmwirkung von Lipopolysacchariden (LPS) auf die hämolytische Aktivität der gereinigten Komplementkomponenten C3 und C5</u>	46
3.1. Hemmung der hämolytischen C3-Aktivität durch LPS von <i>Yersinia enterocolitica</i> 75 (Ye 75)	46
3.2. Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Hemmung von hämolytischem C3 durch LPS-R und LPS-S von Ye 75	47
3.2.1. Inkubationstemperatur	47
3.2.2. pH-Wert	47
3.2.3. Ionenstärke	49
3.3. Bedeutung des Aggregationszustandes von LPS-R und LPS-S von Ye 75 bei deren Reaktion mit C3	51
3.3.1. Elektronenoptische Darstellung verschiedener Aggregationszustände	51
3.3.2. Einfluß von Triethylamin und Lagerung auf die Reaktivität von LPS	55
3.3.3. Einfluß von divalenten Kationen auf die Reaktivität von LPS	57
3.4. Analyse des Reaktionsablaufes bei der Inaktivierung von hämolytischem C3 durch LPS-R und LPS-S von Ye 75	59
3.4.1. Reaktionskinetik	59
3.4.2. Inaktivierungskapazität	63
3.5. Hemmung der hämolytischen C3-Aktivität durch LPS von verschiedenen Bakterienarten und durch isolierte LPS-Strukturkomponenten	65
3.5.1. Vergleich von verschiedenen LPS-Präparationen	66
3.5.2. Einfluß der Lipopolysaccharidstruktur	67
3.5.3. Wirkung von isolierten LPS-Strukturkomponenten	69
4. <u>Hemmung der hämolytischen C5-Aktivität durch LPS-S und LPS-R von <i>Yersinia enterocolitica</i> 75</u>	70
4.1. Wirkung von LPS-R nach Absättigung mit C5 auf die hämolytische Aktivität von C3	73
5. <u>Komplexbildung zwischen C3 und LPS-R und LPS-S von Ye 75</u>	75
5.1. Dichtegradientenzentrifugation der LPS-C3-Komplexe	75

	Seite
5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von LPS-C3-Komplexen	80
5.3. Immunelektrophorese von LPS-C3-Komplexen	83
5.4. Korrelation zwischen Inaktivierung von C3 und Ausbildung von LPS-C3-Komplexen	84
6. <u>Charakterisierung der Bindungsreaktion von C3 an LPS-R von Ye 75</u>	88
6.1. Kinetik der C3-Bindung an LPS-R	89
6.2. Vergleich von C3- und C3b-Bindung an LPS-R	90
6.3. Bindung von C3 und C3-NH ₂ OH an LPS-R	92
6.4. Freisetzung von C3 aus LPS-R-C3-Komplexen	94
7. <u>Bildung der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges mit LPS-C3- und LPS-C3b-Komplexen</u>	97
III. DISKUSSION	102
IV. ZUSAMMENFASSUNG	121
V. MATERIAL UND METHODEN	123
VI. LITERATURVERZEICHNIS	152

Abkürzungen

Ammoniumpersulfat	Ammoniumperoxydisulfat
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
DEAE-	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiotreitol
EACA	ϵ -Amino-n-Caprinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eff. Mol.	effektive Moleküle
KD	Kilodalton
KPO_4	Gemisch aus KH_2PO_4 und K_2HPO_4
LPS	Lipopolysaccharid
MG	Molekulargewicht
mS	Millisiemens
$NADH_2$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
$NaPO_4$	Gemisch aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4
OD_{280}	Absorbtion bei 280 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethyl-Sulphonyl-Flourid
QAE-	Quaternary aminoethyl-
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP-	Sulphopropyl-
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
VBS ⁻⁻⁻	Veronal (5,5-Diethylbarbitursäure) gepufferte Kochsalzlösung

I. EINLEITUNG

1. Das Komplementsystem

Der Begriff Komplement (C) bezeichnet ein komplexes, aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen bestehendes Enzymsystem, das in Säugetieren zur natürlichen Resistenz und Immunabwehr gegenüber Mikroorganismen beiträgt. Die verschiedenen Abwehrmechanismen gliedern sich in humorale und zelluläre Systeme. Komplement ist ein humorales Abwehrsystem. Es erfüllt seine verschiedenen Aufgaben sowohl in der Präimmunphase einer Infektion wie auch in der Immunphase nach Bildung von spezifischen Antikörpern (1-5). Die verschiedenen biologischen Leistungen, die Komplement im Rahmen der komplexen Abwehrreaktionen vollbringt, lassen sich unter den Bezeichnungen Erregerabtötung, Antigenverarbeitung, Entzündungsvermittlung und Immunregulation zusammenfassen.

Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von globulären Glycoproteinen, die an der Aktivierung und Regulation des Enzymsystems beteiligt sind. Diese Proteine wurden vor allem aus Human- und Meerschweinchenserum gereinigt, so daß heute mindestens 16 verschiedene Komponenten bekannt und charakterisiert sind (1, 4, 6). Die Nomenklatur der Komponenten und ihrer Reaktionsprodukte ist festgelegt (7, 8). Einige Proteine werden mit einem C und arabischen Ziffern von 1-9 gekennzeichnet, während andere durch große Buchstaben symbolisiert werden (Tab. 1).

Die Biosynthese der Komplementfaktoren erfolgt in mononukleären Phagozyten (Monozyten, Makrophagen von Kupffer'sche Sternzellen) und in den Leberparenchymzellen (9-11). Unter physiologischen Bedingungen liegen die meisten Komplementproteine im Blut und Gewebe in nativer Form als Zymogene vor. Die zahlreichen biologischen Effekte treten erst auf, wenn das Komplement einen Prozeß der Aktivierung durchlaufen hat.

Komponente	Mol. Gew. (KD)	Serum-Konz. (µg/ml)	Spaltprodukte
Proteine des klassischen Aktivierungsweges bis C3			
C1 (Komplex aus C1q, r und s)	900	300-400	-
C1q	410	250	-
C1r	90	100	-
C1s	90	80	-
C4	209	430	C4a, C4b
C2	117	20	C2b, C2a
C3	190	1300	C3a, C3b
Terminale Reaktionssequenz			
C5	206	75	C5a, C5b
C6	95	60	-
C7	120	55	-
C8	163	80	-
C9	79	160	-
Proteine des alternativen Aktivierungsweges bis C3			
Faktor B	100	150	Ba, Bb
Faktor D	24	2	-
Faktor P	220	30	-
C3	190	1300	C3a, C3b
Regulatorproteine:			
C1INA (C1-Inaktivator)	105	240	-
C4bp (C4-Bindungsprotein)	570	250	-
Faktor I (C3b-Inaktivator)	93	50	-
Faktor H	150	300	-

Tab. 1 Übersicht über die Komplementkomponenten (1, 4)

1.1. Die Aktivierung des Komplementsystems

Die Komplementaktivierung wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch spezielle Aktivatorsubstanzen ohne Antikörperbeteiligung ausgelöst. Die Proteine reagieren dann spezifisch in einer festliegenden Reihenfolge miteinander, wobei sie vom inerten in den biologisch aktiven Zustand

überführt werden (1, 12, 13). Viele der hieran beteiligten Reaktionen sind limitierte proteolytische Spaltungen der nativen Komponenten. Der Aktivierungsprozeß kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen, dem klassischen oder dem alternativen Aktivierungsweg. Beide Reaktionswege verfügen in der Frühphase des Aktivierungsprozesses über zwei voneinander unabhängige Teilsequenzen. Sie münden über die Konversion der dritten Komplementkomponente (C3) in die terminale Reaktionssequenz ein, welche beiden Reaktionswegen gemeinsam ist (Abb. 1).

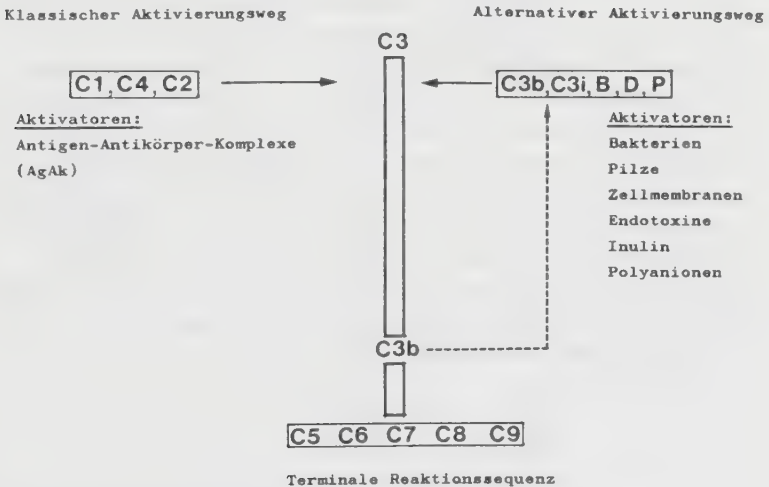


Abb. 1 Aufbau und Aktivierung des Komplementsystems

1.1.1. Der klassische Aktivierungsweg

Durch Antigen-Antikörper-Komplexe (AgAk) erfolgt die Komplementaktivierung in der Reihenfolge C1, 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 über den klassischen Aktivierungsweg. Die Teilsequenz mit den Komponenten C1, C2 und C4 übernimmt die Aufgabe, ein C3-umsetzendes Enzym zu bilden. Bei der Bindung

an das Antigen erfolgt eine sterische Veränderung des Antikörpers, wobei im Bereich der Fc-Region Strukturen freigelegt werden, an die sich das Makromolekül C1 binden kann. Hierdurch und infolge von anschließenden intramolekularen Reaktionsschritten wird C1 in ein proteolytisch aktives Enzym (C1)^x umgewandelt. Nur antigengebundene Antikörper der Klassen IgM und IgG sind zu dieser C1-Aktivierung befähigt (4, 14-16). Das aktivierte C1 kann dann in der Folge die Proteine C4 und C2 in je ein kleines und großes Peptid aufspalten. Die größeren Bruchstücke C4b und C2a fusionieren an der Oberfläche des Immunaggregats zu einem weiteren enzymatisch aktiven Komplex (17-21). Dieser Komplex stellt die klassische C3-Konvertase (C42) dar und spaltet die nächste Komponente, das C3, in die Peptide C3a und C3b. Das größere Fragment C3b bekommt im Augenblick seiner Entstehung eine höchst labile Bindungsstelle, mit der es sich an Oberflächen anheften kann (1, 4, 22-27).

Erfolgt die Fixierung von C3b in unmittelbarer Nähe des C42-Komplexes, so erlangt das trimolekulare C423-Enzym Substratspezifität für C5 (28). Diese C5-Konvertase (C423) leitet mit der Aktivierung von C5 die Bildung des zytotoxischen Membrankomplexes (C5b-9) auf der Oberfläche von Zellmembranen ein.

1.1.2. Der alternative Aktivierungsweg

Die Komplementaktivierung über den alternativen Reaktionsweg wird ohne Antikörperbeteiligung durch Zellen von verschiedenen Mikroorganismen, durch Zellmembranen, durch mikrobielle Polysaccharide, Endotoxine und verschiedene andere Substanzen ausgelöst (29).

^x Der Querstrich über einer Komponente oder über einem Komplex aus Komponenten weist auf den enzymatisch aktiven Zustand hin.

Die aktivierende Teilsequenz dieses Reaktionsweges, die mit der Konversion von C3 eine Aktivierung aller weiteren Komponenten (C5-9) einleitet, besteht aus Serumproteinen, die im klassischen System nicht beteiligt sind.

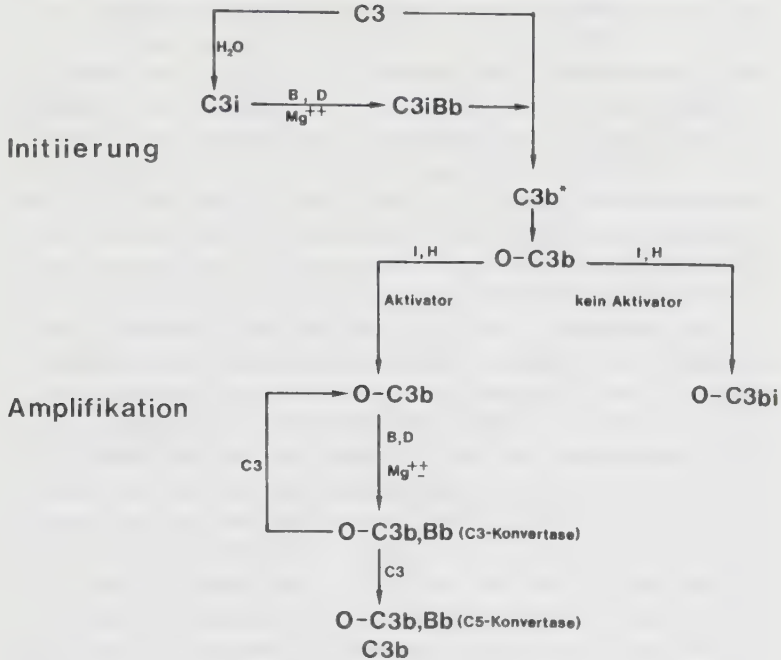


Abb. 2 Bildung der C3- und C5-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges

Mit der Initiierungsreaktion wird die Bildung eines hochreaktiven bindungsfähigen C3b* eingeleitet. Nach Anlagerung an einen Aktivator über eine Esterbindung setzt dieses C3b die Reaktion bis zur Bildung der Konvertasen fort. Wenn die C3b-bindende Substanz aber kein Aktivator ist, wird C3b sehr schnell zu C3bi inaktiviert. Eine Fortsetzung der Reaktionssequenz ist jetzt nicht mehr möglich. Der Faktor P des alternativen Aktivierungsweges, welcher in diesem Schema nicht berücksichtigt ist, übt auf die C3- und C5-Konvertase eine stabilisierende Wirkung aus (weitere Einzelheiten im Text).

An Stelle der Komponenten C1, C4 und C2 wird mit den Komplementfaktoren B, D und dem C3b-Fragment eine alternative C3-Konvertase ($\overline{C3bBb}$) gebildet. Der Faktor P (Properdin), nach dem diese aktivierende Teilsequenz ursprünglich als Properdinsystem bezeichnet wurde, verleiht nach seiner Anlagerung an $\overline{C3bBb}$ der C3-Konvertase lediglich eine größere Stabilität (29-31). Die Auslösung des alternativen Aktivierungsweges bis zur Bildung des $\overline{C3bBb}$ -Enzyms wird derzeit wie folgt erklärt. Im Plasma oder Serum entstehen laufend durch spontane Hydrolyse von C3 geringe Mengen an C3b-ähnlichen Molekülen (C3i) (4, 31, 32). Sie bilden mit Faktor B einen Komplex, aus dem unter der katalytischen Wirkung von D eine "initiiierende" lösliche C3-Konvertase ($\overline{C3iBb}$) entsteht (Abb. 2). Diese wiederum aktiviert natives C3, wodurch hochreaktives C3b generiert wird. Verschiedene Substanzen, die als Aktivatoren wirken, binden das C3b an ihre Oberflächen und entziehen es dadurch dem inaktivierenden Einfluß der Regulatorproteine I und H. Dem vereinten Angriff durch I und H entronnen, kann C3b auf der Oberfläche des Aktivators mit den Faktoren B und D ein $\overline{C3bBb}$ -Enzym bilden, welches dann vermehrt natives C3 spaltet. So entsteht weiteres C3b für die Produktion von mehr C3-Konvertase. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus ist das eigentliche Kernstück des alternativen Reaktionsweges (31, 32-35). Ausgehend von einer geringen Menge an C3b, kann hiermit in kurzer Zeit ein hohes Aktivitätspotential aufgebaut werden (Abb. 2). Wird während der fortgesetzten Aktivierung von C3 das C3b-Fragment auf einer Zelloberfläche in unmittelbarer Nähe der alternativen C3-Konvertase gebunden, so erlangt das Enzym Substratspezifität für C5 (35, 36-38). Mit der Spaltung von C5 setzt sich die Komplementaktivierung über die Komponenten C6-9 fort. Andere Substanzen, welche keine Aktivatoren sind, können wohl C3b binden, welches durch die Wirkung der initiiierenden $\overline{C3iBb}$ -Konvertase entsteht. Gebundenes C3b wird aber in diesem Fall sehr schnell durch die Regulatorproteine I und H zu C3bi

inaktiviert (39, 40). Eine weitere Reaktion mit B und D ist nun nicht mehr möglich (Abb. 2).

1.1.3. Bildung des zytotoxischen Membrankomplexes C5b-9

Mit der Aktivierung der terminalen Reaktionssequenz, die aus den Komponenten C5 bis C9 besteht, wird an Zellmembranen die Bildung eines Proteinkomplexes hervorgerufen, welcher die Lyse von Zellen vermittelt. Hierbei wird zunächst C5 durch die klassische oder durch die alternative C5-Konvertase in die Peptide C5a und C5b aufgespalten. An dem membranständigen C5b vollziehen sich dann die weiteren Aktivierungsschritte, in deren Verlauf es zu einer Komplexbildung mit den nativen Proteinen C6 bis C9 kommt. Es entsteht ein stark hydrophobes, zylinderförmiges Aggregat, das in Wechselwirkung mit dem Lipidanteil einer Zellmembran treten kann. Die eingetretene Membranschädigung, welche elektronenoptisch oft auch als "Loch" in der Membran erkennbar ist, führt zur osmotischen Zellyse. Diese tritt z.B. bei der Reaktion von Komplement mit antikörperbeladenen Zellen (z.B. Erythrozyten) auf. Auch bei vielen gramnegativen Bakterien führt die Komplementaktivierung schnell zum Zelltod (12, 13, 41-45).

1.2. Physiologische Leistungen des Komplementsystems

Die biologischen Wirkungen von Komplement werden erst nach Einleitung des Aktivierungsprozesses erkennbar. Eine Besonderheit des Systems ist es, daß infolge der Aktivierung nicht nur ein zellschädigender Komplex entsteht, der zur Zytolyse einer Fremdzelle führen kann, sondern daß auch im Laufe der dahin führenden Reaktionen verschiedene Peptide generiert werden, welche ihrerseits weitere Reaktionen in Gang setzen. Die kleinen Peptide C3a, C5a und C4a, auch Anaphylatoxine genannt, fungieren als Entzündungsmediatoren. Sie können nach ihrer Entstehung in der löslichen Phase über Membranrezeptoren mit verschiedenen Körperzellen (Mastzellen, Granulo-

zyten, Makrophagen) in Wechselwirkung treten. Dies äußert sich dann in der Freisetzung von Mediatoren aus diesen Zellen oder in der chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten. Die Anregung zur Chemotaxis ist im wesentlichen für die Infiltration des entzündlichen Gewebes mit Leukozyten verantwortlich (1, 4, 46-49).

Das Fragment C3b kann durch seine Fähigkeit zur Bindung an Oberflächen körperfremdes Material opsonisieren. Der Vorgang der Opsonisierung durch C3b-Bindung ist bei der Erregerabwehr von schwer phagozytischen Mikroorganismen von besonderer Bedeutung, da C3b die Bindung von Partikeln an Phagozyten vermittelt und dadurch deren zelluläre Ingestion erleichtert (47, 50, 51). Verschiedene andere Komplement-vermittelte biologische Reaktionen erstrecken sich auf die Virusneutralisation, die Eliminierung von zirkulierenden Immunkomplexen und die Regulation der Immunantwort (4, 5, 52).

Die Kontrolle des Komplementsystems durch regulatorisch wirksame Moleküle gewährleistet, daß die Komplementaktivierung sich zum Nutzen des Organismus auswirkt. Es gibt aber immunpathologische Zustände mit übermäßiger Komplementaktivierung, welche sich vor allem in starken Entzündungsreaktionen äußern (1, 4). Nebenwirkungen von Lipopolysacchariden, welche beim Endotoxinschock besonders reichlich freigesetzt werden, sollen zum Teil wenigstens auf die massive Komplementaktivierung zurückzuführen sein (s. Abschnitt 3).

2. Die Lipopolysaccharide

2.1. Lipopolysaccharide als Bestandteil der Bakterienzellwand

Die Zellwand der Bakterien ist der Cytoplasmamembran nach außen vorgelagert. Bei den gramnegativen Bakterien besteht sie aus einem dünnen, zweidimensionalen Mureinnetz und einer äußeren Membran (53). Die Mureinschicht trägt wesentlich zur mechanischen Stabilität der Zelle bei, während die äußere

Membran als Permeationsbarriere dient. Am Aufbau der äußeren Membran sind Phospholipide, Proteine und Lipopolysaccharide (Endotoxine) beteiligt. Die Lipopolysaccharide (LPS) sind amphipathische Moleküle. Sie sind mit ihrem lipophilen Teil, dem Lipoid A, in der äußeren Membran verankert, während der hydrophile Teil, die Polysaccharidkette, in das umgebende Medium weist. Erst bei der Lyse der Bakterienzelle treten sie als freie Molekülkomplexe auf (53, 54).

2.2. Die chemische Struktur der Lipopolysaccharide

Verschiedene Extraktionsverfahren wurden entwickelt, um LPS aus der Bakterienzellwand herauszulösen (55, 56). Chemische Untersuchungen von extrahierten LPS wiesen alle LPS als makromolekulare Komplexe aus, die stets nach einem einheitlichen Muster aufgebaut sind (57). Sie bestehen, wie am Beispiel des LPS von S. typhimurium erkannt wurde, aus:

a) Lipoid A, einem Phospholipid von ungewöhnlicher Struktur. Es besteht in der Regel aus einem phosphoryliertem β -1,6-gebundenem Glucosamin-Disaccharid, an das langkettige Fettsäuren in Ester- und Amidbindung geknüpft sind. Aus dieser Zusammensetzung lassen sich die hydrophoben Eigenschaften dieses Molekülteiles ableiten.

b) Kernoligosaccharid, das im allgemeinen aus einem Hexose-Pentasaccharid und einem Heptose-desoxy-oktulosäure-Oligosaccharid (KDO) aufgebaut ist. Letzteres stellt die Verbindung zum Lipoid A her. Zur Strukturaufklärung dieses Molekülteiles verwendete man Bakterienmutanten (R-Formen), die gegenüber dem Wildtyp (S-Formen) nur unvollständige Polysaccharidketten bildeten. Auf Grund von genetisch determinierten Defekten in der Biosynthese des LPS bzw. des Kernoligosaccharids fehlten den R-Mutanten entweder nur die O-spezifischen Seitenketten oder zusätzlich auch einzelne Zucker im Kernoligosaccharid. Mit Salmonella-R-Mutanten konnte, basierend auf der chemischen Zucker-Zusammensetzung

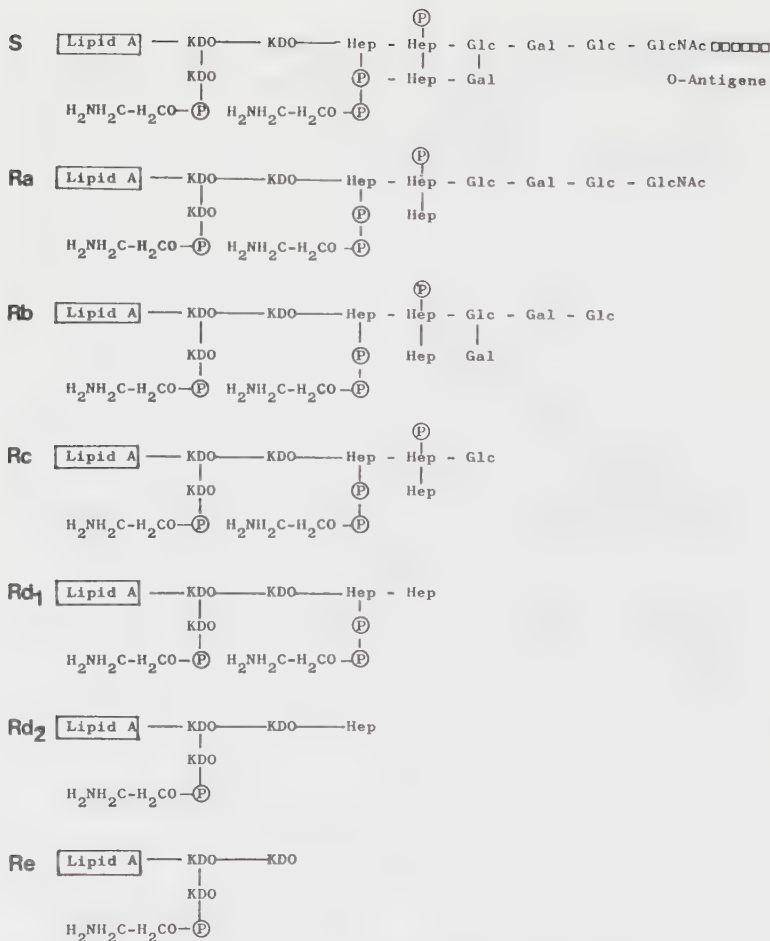


Abb. 3 Struktur des LPS von Salmonella typhimurium in S-Form oder R-Form (verschiedene Mutanten)

Abbildung nach LÜDERITZ et. al. (57)

Abkürzungen: Galactose (Gal); Glucose (Glc);
N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc); L-Glycero-D-mannoheptose (Hep);
2-Keto-3-desoxyoctonat (KDO); Phosphat (P)

des LPS, die in Abb. 3 wiedergegebene Typisierung von verschiedenen R-Formen vorgenommen werden.

c) O-spezifische Seitenketten, die aus sich wiederholenden Untereinheiten desselben Oligosaccharides aufgebaut sind. Sie variieren in ihrer Struktur und chemischen Zusammensetzung bei den verschiedenen Spezies einer Gattung.

2.3. Biologische Eigenschaften von Lipopolysacchariden

Die biologischen Effekte von LPS werden von verschiedenen Strukturkomponenten des Makromoleküles vermittelt. Der Kontakt von höheren Organismen mit gramnegativen Bakterien führt zur Produktion von LPS-Antikörpern, deren Spezifität gegen die Polysaccharidregion der Seitenketten des LPS-Moleküles gerichtet ist. Die serologische Vielfalt der LPS-Antigene wird durch die Variabilität in den O-spezifischen Seitenketten bestimmt. Antikörper gegen LPS haben für den Organismus protektive Bedeutung, da sie an der Beseitigung der gramnegativen Mikroorganismen mitwirken (57). Die endotoxischen Eigenschaften von LPS sind an den Lipid A-Teil gebunden. Die Injektion von gereinigtem LPS bzw. Lipid A führt in höheren Organismen zu einer Reihe von pathophysiologischen Effekten, wie Fieber, Komplementaktivierung und Schockreaktion (58, 59). Man nimmt an, daß die biologischen Eigenschaften von Lipid A durch seine hohe Affinität gegenüber Zellmembranen, Proteinen und Lipiden bedingt werden.

3. Aktivierung von Komplement durch Lipopolysaccharide

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß die Inkubation von Lipopolysacchariden mit Serum zu einer Komplementaktivierung führt (60, 61). Erste Untersuchungen über den Mechanismus der Interaktion von LPS mit Komplement zeigten, daß LPS die späten Komplementkomponenten C3-9 unter Umgehung der Proteine C1, C4 und C2 zu aktivieren vermochte. Parallel

zur Aufklärung des alternativen Aktivierungsweges konnte zunächst demonstriert werden, daß LPS und auch Lipoid A über diesen Reaktionsweg die Komplementaktivierung in Serum vermitteln (62-65).

Andere Experimente haben inzwischen die Kenntnisse über die Komplementaktivierung durch LPS erweitert. Verschiedene LPS-Präparationen können Komplement in Serum nicht nur über den alternativen sondern auch über den klassischen Reaktionsweg aktivieren. Hierbei fungieren verschiedene strukturelle Bereiche des LPS-Moleküles als selektive Aktivatoren der beiden Aktivierungswege. Die Komplementaktivierung über den alternativen Reaktionsweg wird durch die Interaktion der Polysaccharidregion von LPS mit den Komponenten dieses Reaktionsweges vermittelt. Für den klassischen Aktivierungsweg über C1, C4 und C2 stellt das Lipoid A den aktivierenden Teil des LPS-Moleküles dar. Dieser von C1 ausgehende Aktivierungsprozeß kann sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von LPS-spezifischen Antikörpern erfolgen (66-68).

Die durch Lipoid A ausgelöste antikörperunabhängige Aktivierung des klassischen Reaktionsweges stellt eine besondere Form der Interaktion von LPS mit Komplement dar. Sie weist nämlich daraufhin, daß Lipoid A die Komponente C1 direkt binden kann, wodurch C1 ähnlich wie bei der Bindung an Immunkomplexe in den aktivierten Zustand übergeht. Der Beweis für die Bindung von C1 an Lipoid A konnte mit gereinigtem C1 (C1q) erbracht werden (69). Diese Experimente zeigten erstmalig, daß LPS durch eine direkte Reaktion mit einer Komponente die Aktivität sowohl dieser Komponente als auch die des ganzen Komplementsystems beeinflusst.

4. Interaktion von Lipopolysacchariden mit gereinigtem C3: Ausgangspunkt und Problemstellung der Arbeit

Kürzlich wurde auch eine direkte Interaktion von LPS von Yersinia enterocolitica mit gereinigtem C3 aus Meerschweinchen-

serum beschrieben, die zu einem Verlust der hämolytischen C3-Aktivität führte. Erste experimentelle Hinweise für eine Bindung von C3 an LPS als Ursache für diese Inhibition wurden erbracht (70). Die bisher vorliegenden Befunde über die Interaktion von LPS und C3 sollen mit den geplanten Untersuchungen in verschiedenen Punkten erweitert werden. Es wird geprüft, ob die Interaktion mit C3 ganz allgemein eine Fähigkeit von LPS-Präparationen aus verschiedenen Bakterienspezies darstellt und ob sich diese Reaktionsfähigkeit auch auf andere Komplementproteine wie C5 erstreckt. Der Mechanismus, welcher der C3-Hemmung zugrunde liegt, soll analysiert werden. Schließlich stellt sich die Frage nach den Reaktionsprodukten, welche aus der Interaktion von LPS und C3 hervorgehen. Sofern sich die vermutete Komplexbildung zwischen LPS und C3 (70) nachweisen läßt, wird eine wichtige experimentelle Aufgabe darin bestehen, die Struktur und Reaktivität des gebundenen C3 zu untersuchen und die Wirkung solcher Komplexe auf das Komplementsystem zu prüfen.

Die Durchführung dieser Experimente erfordert zunächst die Entwicklung eines gegenüber bekannten Methoden verbesserten Reinigungsverfahrens für C3 und C5 aus Meerschweinchenserum. Diese präparative Aufgabe mit gleichzeitiger Charakterisierung der Reinigungsprodukte ist daher den Untersuchungen über deren Reaktion mit LPS vorangestellt.

II. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Reinigung der Komplementkomponenten C3 und C5 aus Meerschweinchenserum

Den Schwerpunkt der experimentellen Untersuchungen bildete zunächst die Reindarstellung und Charakterisierung der Komplementproteine C3 und C5. Für die Isolierung von C3 und C5 aus Meerschweinchenserum wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt, über welches das anschließende Schema 1 einen Überblick gibt. Die einzelnen Reinigungsschritte werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

1.1. Polyethylenglycol (PEG) - Fraktionierung für die Fällung von C3 und C5

Eine Lösung von 25% (w/v) PEG erwies sich in Vorversuchen für die Ausfällung von C3 und C5 als gut geeignet. Um partielle Überkonzentrationen von PEG während der Fällung zu vermeiden, erfolgte die Fraktionierung mit der 25%igen PEG-Lösung in zwei Schritten (71). Nach einer 5% (w/v) PEG-Fällung des Serums wurde der resultierende Überstand erneut mit PEG bis zu einer Endkonzentration von 12% (w/v) versetzt. Anschließend wurden die Sedimente beider Fällungsschritte in Puffer resuspendiert und vereinigt.

Mit einer Endkonzentration von 12% (w/v) PEG wurden beide Proteine quantitativ ausgefällt, wobei sich nur geringe Aktivitätsverluste ergaben. Ein repräsentatives Anreicherungs-ergebnis für C3 und C5 nach Fraktionierung von Meerschweinchenserum mit PEG gibt Tabelle 2 wieder. Der Anteil des abgetrennten Fremdproteins (aus 4 Reinigungen ermittelt) lag durchschnittlich bei ca. 70%.

Meerschweinchen Serum



5% PEG-Fällung; Zentrifugation für 30 min bei 10000 UpM;
Sedimente in Puffer resuspendieren; Überstände vereinigen



12% PEG-Fällung der vereinigten Überstände; Zentrifugation
für 30 min bei 10000 UpM; Überstände aufbewahren; Sedimente
in Puffer resuspendieren



Affinitätschromatographie der gelösten und vereinigten
Präzipitate beider Fällungsschritte an Lysin-Sephrose 4B



Ionenaustauscherchromatographie aller Fraktionen mit
C3- und C5-Aktivität an DEAE-Sephacel



Ionenaustauscherchromato-
graphie der Fraktionen
mit C3-Aktivität an
SP-Sephadex C 50

Gelfiltration der konzentrierten
Fraktionen mit C5-Aktivität
über Sephacryl S 300



Gelfiltration über
Sephacryl S 300

Adsorptionschromatographie
mit Hydroxylapatit



Gereinigtes C3

Ionenaustauscherchromatographie
an QAE Sephadex A 50



Gereinigtes C5

Tabelle 2 Anreicherung von C3 und C5 aus Meerschweinchen-serum nach Fraktionierung mit PEG

	C 3 / C 5			
	Ges. Aktivität (eff. Mol. x 10 ¹²)	Ausbeute (%)	Spez. Aktivität (eff. Mol./mg x 10 ⁹)	Ges. Protein (mg)
Serum	10 / 641	100/100	1,1 / 73,4	8730
Überstand (5%)	7 / 371	69/ 58	0,9 / 48	7705
Sediment ^x (5%)	3,3/ 243	32/ 38	4,0 / 296	820
Überstand (12%)	0,2/ 6	2/ 1	0,03 / 1,1	5073
Sediment ^x (12%)	7 / 358	67/ 56	3,2 / 168	2120
Sediment ^x (5% + 12%)	10 / 597	98/ 94	3,3 / 201	2960

^x resuspendiert in 100 mM KPO_4 -Puffer / 150 mM NaCl / 5 mM EDTA / 0,5 mM PMSF; pH_{7,4}

1.2. Affinitätschromatographie mit Lysin-Sepharose 4B für die Abtrennung von Plasminogen

Das gelöste Sediment der PEG-Fällung (400 ml) mit einer Gesamtaktivität von etwa 10×10^{12} eff. Molekülen C3 und von etwa 597×10^{12} eff. Molekülen C5 und mit einem Proteingehalt von ca. 7,5 mg/ml wurde zur Abtrennung von Plasminogen auf eine Lysin-Sepharose 4B - Säule aufgetragen (72). Dieser Schritt war notwendig, da Plasmin, welches durch auto-katalytische Aktivierung aus Plasminogen entsteht, zu einer Aktivierung von C3 führen kann (73). Zur Vermeidung von

anderen unspezifischen Aktivierungen enthielt der Reinigungspuffer zusätzlich noch EACA und den Serinesterase-Inhibitor PMSF.

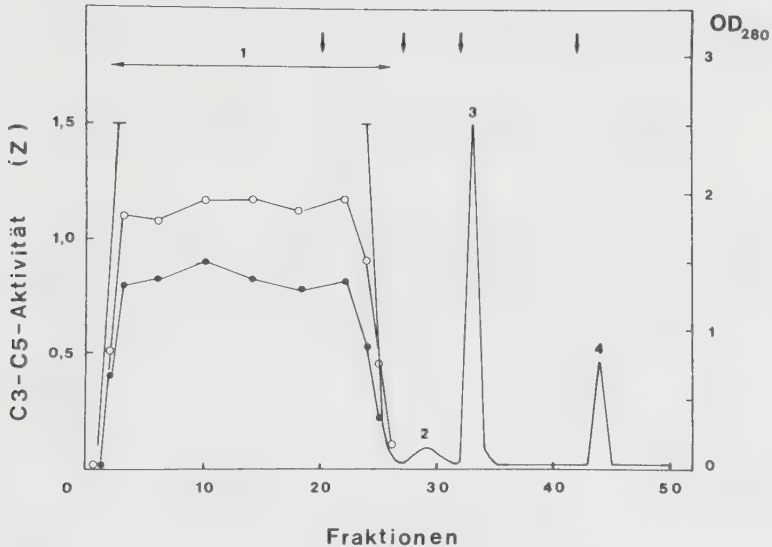


Abb. 4 Lysin-Sepharose 4B-Chromatographie zur Abtrennung von Plasminogen

C3-Aktivität ● — ●
 C5-Aktivität ○ — ○
 Protein E₂₈₀ — — —

Der Pfeil ← — → markiert den Bereich der vereinigten Fraktionen mit C3- und C5-Aktivität (1); unspezifisch gebundenes Protein (2); Plasminogen (3); unspezifisch gebundenes Protein (4).
 Die Pfeile (↓) markieren die Fraktionen, bei denen jeweils ein Pufferwechsel vorgenommen wurde (s. Methoden 4.2.2.).

Aus dem Elutionsprofil eines repräsentativen Säulenlaufes (Abb. 4) ist zu erkennen, daß die Aktivität von C3 und C5 im Peak 1 wiedergefunden wurde. Plasminogen wurde dagegen erst durch Elution mit 0,2 M EACA von der Säule abgetrennt (Peak 3). Alle Fraktionen mit C3- und C5-Aktivität wurden vereinigt und gegen den Äquilibrierungspuffer der DEAE-Sephacel Säule dialysiert.

1.3. Anionenaustauscherchromatographie von C3 und C5 mit DEAE-Sephacel

Bei der Chromatographie mit DEAE-Sephacel wurden C3 und C5 mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert (Abb. 5). Mit diesem Reinigungsschritt erfolgte bereits eine vollständige Trennung der Komplementproteine C3 und C5.

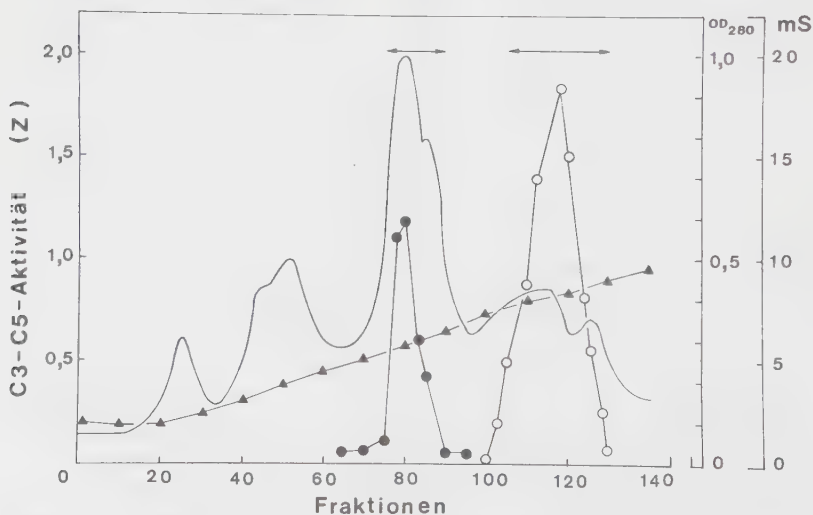


Abb. 5 DEAE-Sephacel-Chromatographie von C3 und C5

C3-Aktivität ●—●
C5-Aktivität ○—○

Protein E 280 —
mS (4°C) —

Mit den Markierungen wurde der Bereich der jeweils vereinigten Fraktionen gekennzeichnet.

Aktives C3 eluierte bei einer Ionenleitfähigkeit zwischen 5 und 6 mS (4°C), während die C5-Aktivität erst zwischen 7,5 und 9 mS (4°C) gefunden wurde. Nach Vereinigung der Fraktionen 75-90 lag die C3-Aktivität ca. 40-fach angereichert vor. Eine mit diesem Proteinpräparat durchgeführte Gelelektrophorese (Standard: 7,5% Acrylamid + 0,1% SDS) wies nach der Proteinfärbung in der Regel eine Haupt- und drei Nebenbanden auf. Weitere Reinigungsschritte für C3 waren daher notwendig.

Nach Vereinigung der Fraktionen mit C5-Aktivität (105-130) und anschließender Ultrafiltration (Membran X M 100 A) lag das C5-Protein ca. 35-fach angereichert vor. Auch hier waren mit einer Standard-Gelelektrophorese (7,5% Acrylamid + 0,1% SDS) anhand unspezifischer Proteinfärbung noch bis zu 5 verschiedene Banden zu erkennen. Weitere Schritte zur Reinigung des C5 werden ab Abschnitt 1.8. beschrieben.

1.4. Kationenaustauscherchromatographie für C3 mit SP-Sephadex C50

Die vereinigten Fraktionen der DEAE-Sephacel Säule mit C3-Aktivität wurden auf den Kationenaustauscher SP-Sephadex C50 aufgetragen. Nach Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten (0-300 mM NaCl) eluierte aktives C3 in einem Bereich entsprechend einer Ionenleitfähigkeit von 6,5 - 7,5 mS (4°C) (Abb. 6). Mit einer spezifischen Aktivität von 96×10^9 eff. Mol./ml in den vereinigten Fraktionen lag das C3-Protein ca. 80-fach angereichert vor. Gelelektrophoretische Analysen zeigten, daß bereits mit diesem Reinigungsschritt ein homogenes Proteinpräparat erzielt werden konnte, wenn nur die Fraktionen mit sehr hoher C3-Aktivität vereinigt wurden. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde aber häufig eine größere Fraktionenzahl vereinigt. Dann erforderte die C3-Reinigung einen zusätzlichen Chromatographieschritt.

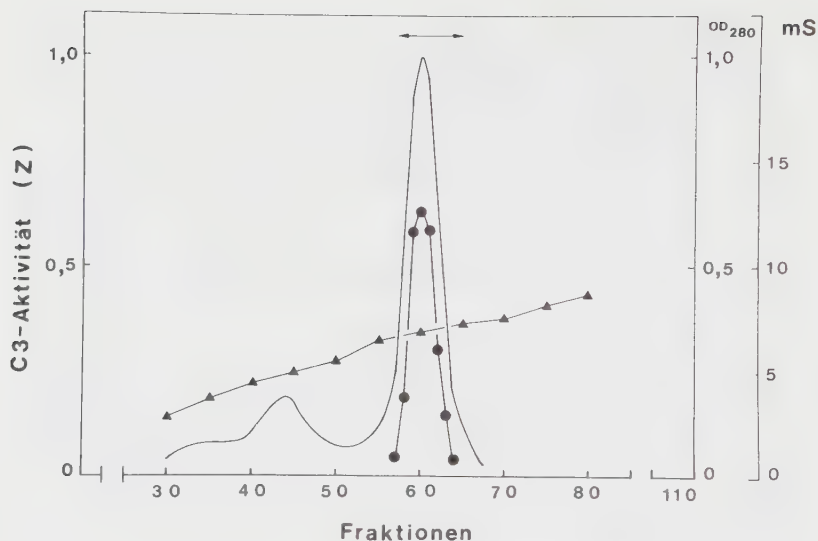


Abb. 6 Sp-Sephadex C50 - Chromatographie von C3

C3-Aktivität ● — ●
 Protein E₂₈₀ — — —
 mS (4°C) ▲ — ▲

Die Fraktionen 57-65 (← — — — →) wurden vereinigt und in einer UF-Zelle (Membran X M 100 A) konzentriert.

1.5. Gelchromatographie für C3 mit Sephacryl S 300

Die konzentrierten Fraktionen von der SP-Sephadex C50 Säule mit C3-Aktivität wurden in einem Volumen von 5 ml aufgetragen. Aus Abb. 7 ist zu erkennen, daß nach dieser Gel-filtration die Protein- und Aktivitätsprofile vollständig übereinstimmten. Die Fraktionen mit hoher C3-Aktivität (Fraktion 191-205) wurden vereinigt und auf 10 ml ankonzentriert. Dieses Konzentrat enthielt reines C3 wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird. Am Ende dieser Reinigung lag der Anreicherungsfaktor für C3 bei ca. 85 und die spezifische Aktivität betrug ca. $1,0 \times 10^{11}$ eff. Mol./mg.

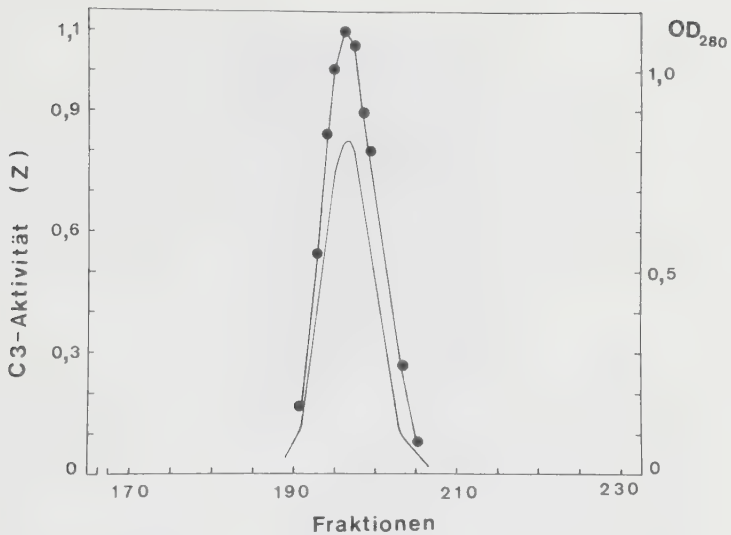


Abb. 7 Sephacryl S 300 Chromatographie von C3

C3-Aktivität ● ————— ●

Protein E₂₈₀ |—————|

Die Fraktionen 191-205 wurden vereinigt und in einer UF-Zelle (Membran X M 100 A) ankonzentriert.

1.6. Reinheitsanalyse des isolierten C3

1.6.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit der analytischen PAGE wurde das isolierte C3 nach dem letzten Chromatographieschritt (Sephacryl S 300) auf Reinheit geprüft. Mit einem Gelsystem (Abb. 8) aus 5% Acrylamid ließ sich nach unspezifischer Proteinfärbung nur eine einzige Proteinbande erkennen.

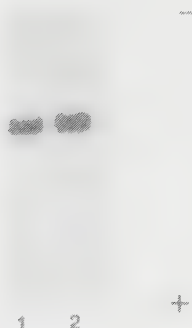


Abb. 8 Disk-Elektrophorese von gereinigtem C3 in einem 5%igen Polyacrylamidgel

Bahn:

1. 15 µg Protein (C3)
2. 30 µg Protein (C3)

Durchführung der Elektrophorese siehe Methoden (10.2.).

Das gleiche Ergebnis erbrachte ein anderes Gelsystem (7,5% Acrylamid + 0,1% SDS), in dem das Protein unter denaturierenden Bedingungen im nichtreduzierten Zustand aufgetrennt wurde (Abb. 9; Bahn 1,2). Nach Reduktion mit DTT (40 mM) waren in diesem Gelsystem die für C3 typischen Untereinheiten (α - und β -Kette) zu sehen (Abb. 9; Bahn 3,4). Unter den hier gewählten Denaturierungsbedingungen traten keine zusätzlichen Banden auf.

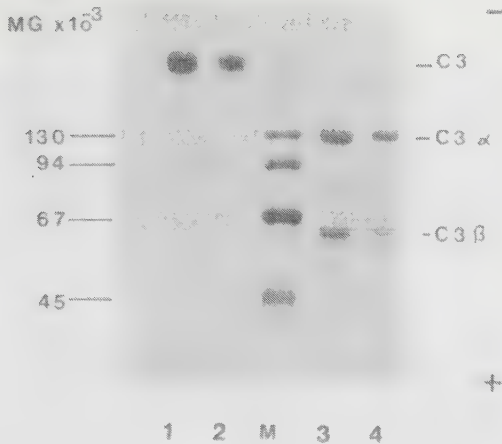


Abb. 9 SDS-Elektrophorese von gereinigtem C3 in einem 7,5% igen Polyacrylamidgel

Bahn:

1. 20 µg Protein (C3)
2. 10 µg Protein (C3)
3. 20 µg Protein (C3), reduziert
4. 10 µg Protein (C3), reduziert
- M. Referenzproteine je 10 µg, reduziert: β -Galactosidase (130 KD), Phosphorylase a (94 KD), BSA (67 KD), Ovalbumin (45 KD)

Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte bei 37°C für 30 min.

Durchführung der Elektrophorese siehe Methoden (10.1.).

1.6.2. Immunelektrophorese

Zur Gewinnung eines Antiserums wurden Kaninchen mit 0,3 mg C3 vom letzten Chromatographieschritt (Sephacryl S 300) immunisiert. Das gewonnene Antiserum wurde dann auf seine Monospezifität gegenüber dem gereinigten C3 sowie gegenüber frischem Meerschweinchenserum getestet. Der Nachweis einer einzigen Präzipitationslinie (Abb. 10 a;b) in beiden

Experimenten zeigte, daß nur gegen C3 gerichtete Antikörper gebildet worden waren.

Abb. 10 a

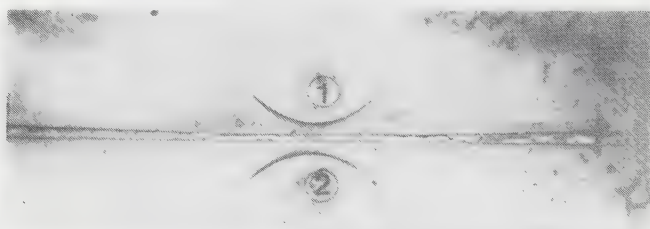


Abb. 10 b

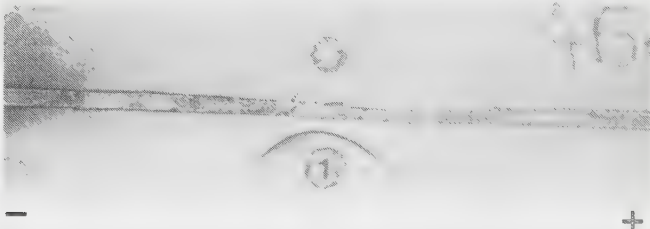


Abb. 10 Immunelektrophorese von Meerschweinchenserum und gereinigtem C3 mit dem gewonnenen Anti-C3 Antiserum

- a. Loch 1: 15 μ l Meerschweinchenserum
 Loch 2: 7,5 μ l Meerschweinchenserum
 Rinne : 100 μ l Anti-C3 Antiserum
- b. Loch 1: 10 μ l C3 ($\hat{=}$ 10 μ g Protein)
 Rinne : 100 μ l Anti-C3 Antiserum

Durchführung der Elektrophorese siehe Methoden (11.).

1.7. Zusammenfassende Darstellung einer C3-Reinigung aus Meerschweinchenserum

Einen Überblick über eine repräsentative Isolierung von C3 aus Meerschweinchenserum gibt Tabelle 3.

Bei einer maximal erreichten spezifischen Aktivität von 102×10^9 eff. Mol./mg Protein und einem Anreicherungsfaktor von 87 betrug die Ausbeute nach dem letzten Reinigungsschritt 55%. Das so isolierte C3 konnte bei -70°C gelagert werden,

Tabelle 3 Reinigung von C3 aus Meerschweinchenserum

Reinigungsschritt	Vol. (ml)	Ges. Protein (mg)	Spez. Aktivität (eff. Mol./mg $\times 10^9$)	Ges. Aktivität (eff. Mol. $\times 10^{12}$)	Ausbeute (%)	Anreicherungs- faktor
Serum	150	8730	1,17	10,2	100	1
Präzipitat aus 5% und 12% PEG	400	2960	3,38	10	98	2,8
Lysin-Sephacrose 4B Fraktion 2-26	430	2580	3,47	8,97	88	3,0
DEAE-Sephacel Fraktion 75-90	280	160	45,9	7,34	72	39
SP-Sephadex C50 Fraktion 57-65	160	69	96,1	6,63	65	82
Sephacryl S 300 Fraktion 191-205	22	54	113	6,12	60	97
Konzentrat	10	55	102	5,61	55	87

wobei innerhalb eines Zeitraums von 6 Monaten der Verlust an hämolytischer Aktivität nie größer als 5% war. Bei geringer Proteinkonzentration ($< 1 \text{ mg/ml}$) trat allerdings unter den gleichen Bedingungen eine C3-Inaktivierung bis zu 20% ein.

1.8. Gelfiltration von C5 an Sephacryl S 300

Zur weiteren Reinigung des C5-Präparates von der DEAE-Sephacel Säule (s. 1.3.) wurde Sephacryl S 300 eingesetzt, da es eine gute Trennung bis zu einem Molekulargewichtsbereich von $1,5 \times 10^6$ ermöglicht (Informationsschrift der Firma Pharmacia). Die vereinigten Fraktionen mit C5-Aktivität wurden nach Ankonzentration in einem Volumen von 6 ml ($3,6 \times 10^{14}$ eff.Mol.; 150 mg Protein) auf die Säule aufgetragen. Das Elutionsprofil eines repräsentativen Säulenlaufes zeigt Abb. 11.

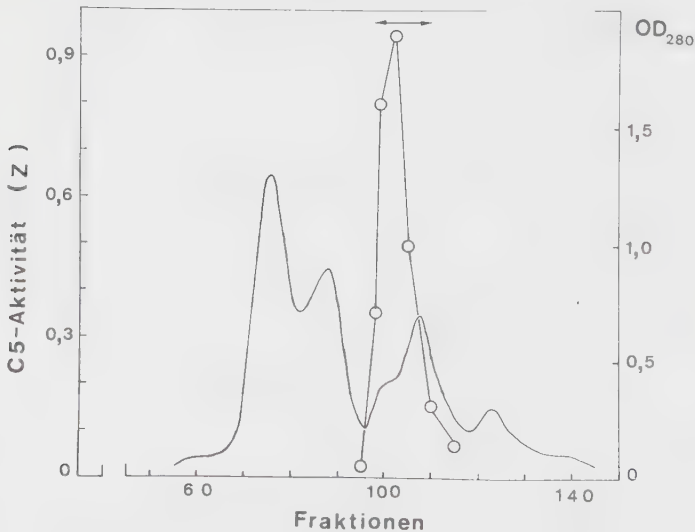


Abb. 11 Sephacryl S 300 Chromatographie von C5

C5-Aktivität ○ — ○

Protein E₂₈₀ — — —

Mit dem Pfeil (← →) wurde der Bereich der vereinigten Fraktionen markiert.

Mit diesem Reinigungsschritt konnte viel Protein mit höherem Molekulargewicht von C5 abgetrennt werden. Nach Vereinigung der Fraktionen mit C5-Aktivität (Fraktion 97-110) ergab dieser Reinigungsschritt in Bezug auf den Proteingehalt eine Abtrennung von ca. 75% Fremdprotein. Mit einer spezifischen Aktivität von $8,5 \times 10^{12}$ eff. Mol./mg konnte ein Anreicherungsfaktor von ca. 110 ermittelt werden. Eine weitere Reinigung dieses C5-Präparates war erforderlich, da nach Auftrennung in der Gelelektrophorese und nach unspezifischer Proteinfärbung neben einer Hauptbande noch drei schwach angefärbte Banden zu erkennen waren.

1.9. Adsorptionschromatographie von C5 an Hydroxylapatit

Die vereinigten Fraktionen der Sephacryl S 300 Säule mit C5-Aktivität wurden auf eine Säule mit Hydroxylapatit als Gelmaterial aufgetragen, welches Proteine ähnlich wie DEAE-Austauscher nach ihrer Nettoladung trennt. Aktives C5 wurde mit einem linearen Gradienten von 25-500 mM KPO_4 eluiert (Abb. 12). Diese Reinigung erbrachte im Aktivitätsbereich von C5 eine Identität von Protein- und Aktivitätsprofil. Im Durchschnitt (aus 5 Reinigungen ermittelt) ergab dieser Reinigungsschritt einen Anreicherungsfaktor von 150. Der Anteil des abgetrennten Proteins belief sich nach Vereinigung der Fraktionen 130-150 auf 70%. Wegen gelelektrophoretisch noch nachweisbarer Kontaminationen mußte aber ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden.

1.10. Anionenaustauscherchromatographie von C5

Die vereinigten Fraktionen von der Hydroxylapatit-Säule mit C5-Aktivität wurden auf eine QAE-Sephadex A 50 - Säule aufgetragen. Das adsorbierte C5-Protein eluierte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-300 mM) im Bereich einer Ionenleitfähigkeit von 13-14 mS (4°C) als symmetrischer Protein- und Aktivitätspeak (Abb. 13).

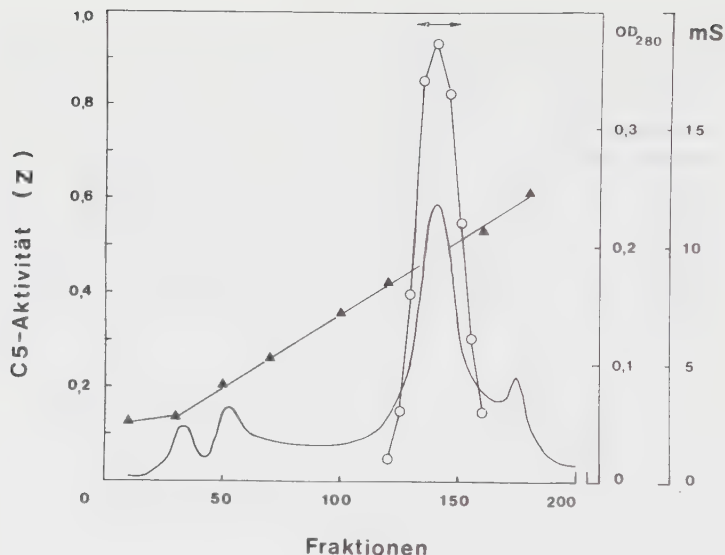


Abb. 12 Hydroxylapatit-Chromatographie von C5

C5-Aktivität ○ — ○

Protein E₂₈₀ | — |

mS (4°C) ▲ — ▲

Der Pfeil (← — →) markiert den Bereich der vereinigten Fraktionen.

Die Fraktionen 98-107 wurden vereinigt und auf 2 ml eingengt. Diese C5-Präparation wies eine spezifische Aktivität von $1,9 \times 10^{12}$ eff. Mol./mg auf. Der Anreicherungsfaktor belief sich nach diesem Reinigungsschritt auf ca. 250. Die im folgenden Abschnitt dargestellte Reinheitsanalyse erbrachte den Nachweis, daß das Konzentrat hochgereinigtes C5 enthielt.

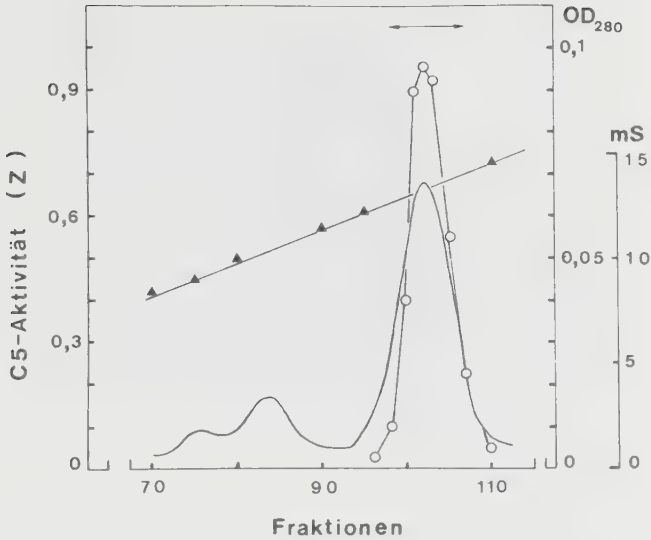


Abb. 13 QAE-Sephadex A 50 Chromatographie von C5

C5-Aktivität ○ — ○

Protein E₂₈₀ — — —

mS (4°C) ▲ — ▲

Der Pfeil (↔) markiert den Bereich der vereinigten Fraktionen.

1.11. Reinheitsanalyse des isolierten C5

1.11.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Reinheitsanalyse des C5-Präparates nach dem letzten Reinigungsschritt (QAE-Sephadex A 50) wurde in zwei Gelsystemen durchgeführt. Mit einem 5% Acrylamidgel war nach elektrophoretischer Auftrennung und unspezifischer Proteinfärbung nur eine Bande im Gel zu erkennen (Abb. 14).



Abb. 14 Disk-Elektrophorese von C5 in einem 5%igen Polyacrylamidgel

Bahn:

1. 15 μ g Protein (C5)
2. 30 μ g Protein (C5)

Die Flachgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (7,5% Acrylamid + 0,1% SDS) zeigte nach Reduktion mit DTT (40 mM) zwei Untereinheiten (α - und β -Kette); eine weitere Proteinbande wurde im Bereich zwischen der α - und β -Kette beobachtet (Abb. 15; Bahn 3,4). Ohne Reduktion trat dagegen nur eine Proteinbande in der Flachgelelektrophorese auf (Abb. 15; Bahn 1,2). Diese Beobachtungen entsprechen Befunden, wie sie für gereinigtes humanes C5 unter vergleichbaren Bedingungen erhoben wurden (74).

1.11.2. Immunelektrophorese

Mit 0,3 mg des hochgereinigten C5-Präparates von der QAE-Sephadex A 50 Säule wurden Kaninchen zur Gewinnung eines Antiserums immunisiert.

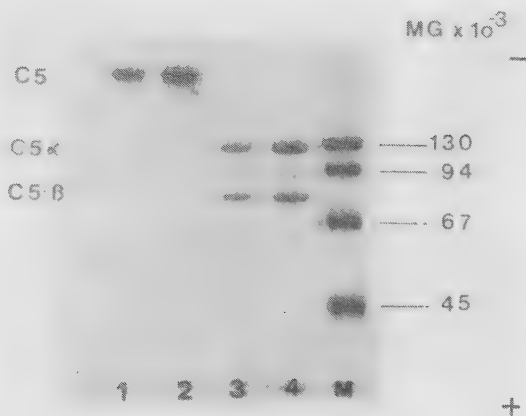


Abb. 15 SDS-Elektrophorese von C5 in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel

Bahn:

1. 10 µg Protein (C5)
2. 20 µg Protein (C5)
3. 10 µg Protein (C5), reduziert
4. 20 µg Protein (C5), reduziert
- M. Referenzproteine je 10 µg, reduziert (wie in Legende zu Abb. 9)

Die Denaturierung erfolgte bei 37°C für 30 min in Abwesenheit von Harnstoff (4 M).

Die Monospezifität des Antiserums wurde durch eine einzige Präzipitationslinie mit gereinigtem C5 und frischem Meer-schweinchenserum nachgewiesen. Auffallend war die stärkere anodische Wanderung des gereinigten C5 im Vergleich zum Serum-C5 (Abb. 16).

Abb. 16 a

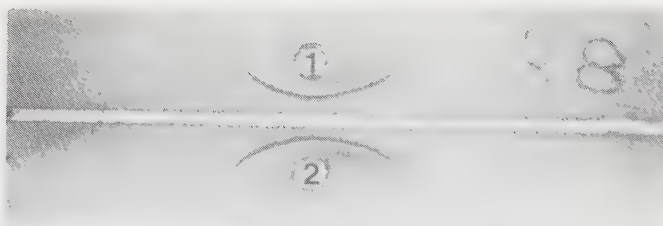
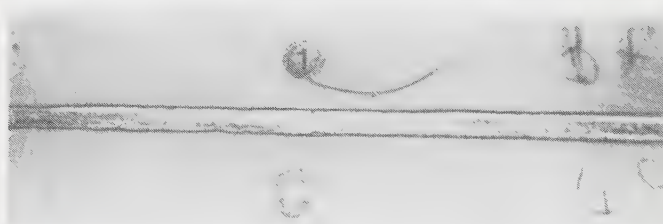


Abb. 16 b



-

+

Abb. 16 Immunelektrophorese von Meerschweinchenserum und von gereinigtem C5 mit Anti-C5 Antiserum

- a. Loch 1: 20 μ l Meerschweinchenserum
Loch 2: 10 μ l Meerschweinchenserum
Rinne : 100 μ l Anti-C5 Antiserum
- b. Loch 1: 15 μ l C5 ($\approx$ 3 μ g Protein)
Rinne : 100 μ l Anti-C5 Antiserum

1.12. Zusammenfassende Darstellung einer Reinigung von C5 aus Meerschweinchenserum

In Tabelle 4 ist eine repräsentative Isolierung von C5 aus Meerschweinchenserum wiedergegeben. Im Vergleich zur Reinigung von C3 waren für die Gewinnung eines homogenen C5-Präparates mehr Reinigungsschritte erforderlich. Dementsprechend lag die C5-Ausbeute mit 13% deutlich unter der Ausbeute von C3 (Tab. 3). Der Anreicherungsfaktor lag im Mittel bei 250 und die spezifische Aktivität betrug durchschnittlich $1,9 \times 10^{12}$ eff. Mol./mg Protein.

Tabelle 4

Reinigung von C5 aus Meerschweinchenserum

Reinigungsschritt	Vol. (ml)	Ges. Protein (mg)	Spez. Aktivität (eff. Mol./mg $\times 10^{10}$)	Ges. Aktivität (eff. Mol. $\times 10^{10}$)	Ausbeute (%)	Anreicherungs- faktor
Serum	150	8730	7,34	6,41	100	1
Präzipitat aus 5% und 12% PEG	400	2960	20	5,97	93	2,7
Lysin-Sepharose 4B Fr. 2-28	490	2580	21	5,56	86	2,8
DEAE-Sephacel Fr. 105-130 (konz) ✕	6	150	240	3,61	56	32,6
Sephacryl S 300 Fr. 97-110	33	35,3	850	2,98	47	115
Hydroxylapatit Fr. 130-150	50	10,5	1130	1,19	19	153
QAE-Sephadex A 50 Fr. 101-107 (konz) ✕	2	4,6	1900	0,86	13	258

✕ Konzentrat der vereinigten Fraktionen

Das gereinigte C5 (ca. 2 mg/ml) konnte bei -70°C gelagert werden. Der Verlust an hämolytischer Aktivität belief sich in einem Zeitraum von 6 Monaten auf ca. 15%. Mit abnehmender Proteinkonzentration verhielt sich das Protein labiler, so daß die Aktivität nur durch Zusatz von 0,5% Gelatine erhalten werden konnte.

2. Charakterisierung von gereinigtem C3 und C5

2.1. Molekulargewichte von C3 und C5 in der Dichtegradientenzentrifugation

Gradientenzentrifugation in Sucroselösungen wurde von DE DUVE et. al. (75), sowie von BRITTEN und ROBERTS (76) zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten von Viren, Mitochondrien und Ribosomen herangezogen. MARTIN und AMES (77) übertrugen diese Methode auf Moleküle mit geringerem MG. Makromoleküle wandern in einem Gradienten zunehmender Dichte mit gleichbleibender Geschwindigkeit (gültig für einen Temperaturbereich von $3-15^{\circ}\text{C}$). Das Verhältnis der Entfernungen, die zwei Substanzen vom Meniskus aus zurückgelegt haben, ist daher immer konstant. Für die Bestimmung der Svedberg-Konstanten genügt bei dieser Methode die relative Lage der Banden. Das Verhältnis (R) kann theoretisch nach jeder beliebigen Zentrifugationsdauer bestimmt werden.

$$R = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Unbekannten}}{\text{Wanderungsstrecke des Standards}} = \frac{S_{20,w} \text{ unbekannt}}{S_{20,w} \text{ Standard}}$$

In den hier durchgeführten Experimenten wurden Gradienten von 2,5% - 20% (w/v) Sucrose eingesetzt. Die Gradienten wurden kontinuierlich geformt und nach Stabilisierung mit dem Proteingemisch (Katalase, Aldolase, Cyt. C, C3 bzw. C5; je 0,5 mg) beschickt. Die Molekulargewichtsbestimmung mit Humanalbumin als Referenzprotein erfolgte in dem gleichen Zentrifugationslauf in einem separaten Gradientenröhrchen.

Nach der Zentrifugation wurden die Gradientenröhrchen ausgetropft und in den Fraktionen wurden Aktivität bzw. Adsorption für die graphische Auswertung bestimmt. Abbildung 17 zeigt ein repräsentatives Ergebnis für die Sedimentation von C3 und Referenzproteinen.

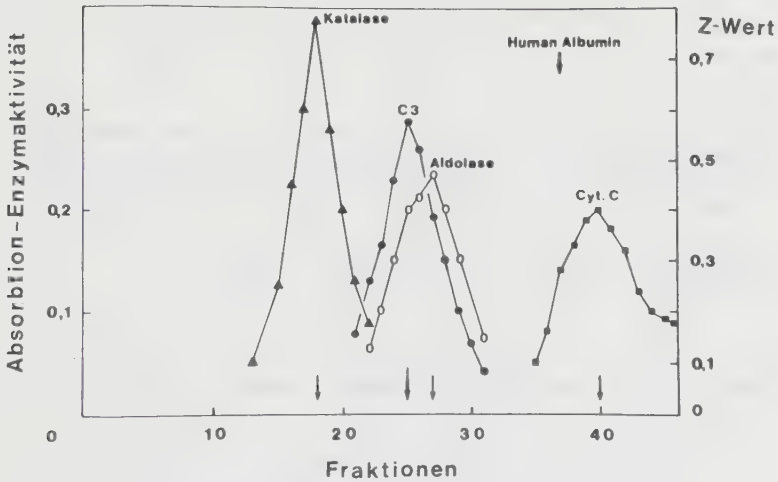


Abb. 17 Sedimentation von C3 und Referenzproteinen in einem linearen Sucrose-Gradienten

12 ml eines linearen Sucrose-Gradienten (2,5%-20% (w/v) in 10 mM KPO_4 -Puffer / 150 mM NaCl; pH 7,0) wurden mit 0,5 ml des Proteingemisches überschichtet und 17 h bei 35000 UpM zentrifugiert. Mit (↓) wurden die Peakmaxima markiert.

Die Sedimentationskoeffizienten $S_{20,W}$ und die Molekulargewichte für C3 und C5 wurden mit Hilfe der bekannten Daten für die Referenzproteine nach den üblichen Formeln errechnet (78). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Tab. 5 Bestimmung von Sedimentationskonstante und Molekulargewicht für C3 und C5

Referenzprotein	$S_{20,W}^{\times}$		$MG \times 10^3^{\times}$	
	C3	C5	C3	C5
Katalase	8,57 / 8,96		163 / 175	
Aldolase	8,10 / 8,43		173 / 181	
Humanalbumin	8,43 / 8,83		170 / 181	

$\times$ Molekulargewicht und Sedimentationskonstante der Standardproteine für die Berechnung wurden aus der Literatur entnommen.

Katalase	: MG = 247000	$S_{20,W} = 11,3$
Aldolase	: MG = 147000	$S_{20,W} = 7,25$
Humanalbumin:	MG = 68000	$S_{20,W} = 4,8$

Für C3 ergab sich im Mittel ein MG von 169000, während für C5 ein MG von 179000 bestimmt werden konnte.

2.2. Molekulargewichte von C3 und C5 in der Gelfiltration

Als weitere Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde die Gelfiltration an Sephacryl S 300 (superfine) eingesetzt. Die Elutionsvolumina von C3 und von Referenzproteinen nach Filtration mit der Sephacryl S 300 Säule wurden in Abb.18 dargestellt. Die Verteilung der Proteine in den gesammelten Fraktionen wurde durch Bestimmung der Aktivität (Katalase, Aldolase und C3) oder durch Messung der Absorption (Ferritin 400 nm; Cytochrom C 415 nm; Albumin 280 nm) ermittelt. Das Ausschlußvolumen (V_o) wurde durch Messung der Absorption von Dextranblau (600 nm) festgelegt. Die Bestimmung des Elutionsvolumens von C5 erfolgte unter identischen Versuchsbedingungen. Zusätzlich wurde noch das in dieser Arbeit gereinigte C3 als Referenzprotein eingesetzt.

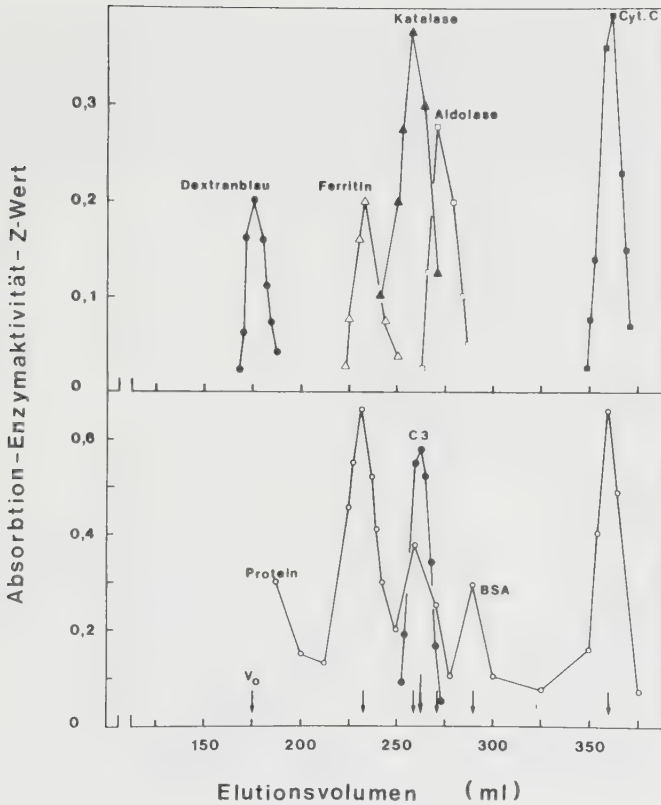


Abb. 18 Elutionsprofil eines Proteingemisches zur
MG-Bestimmung von C3

Die Absorptions- bzw. Aktivitätsmaxima wurden mit einem
Pfeil (↓) markiert.

Für die graphische Auswertung und Molekulargewichtsbestimmung
von C3 und C5 wurde der dekadische Logarithmus des Molekular-
gewichtes gegen das Elutionsvolumen der Peak-Fractionen der
eingesetzten Eichproteine aufgetragen. Die in der Literatur

angegebene lineare Beziehung zwischen Elutionsvolumen und logarithmisch aufgetragenen Molekulargewichten von globulären Proteinen wurde wiedergefunden (79, 80). Mit Hilfe der ermittelten Elutionsvolumina (V_e) ließ sich das Molekulargewicht von nativem C3 mit 184 KD und von C5 mit 204 KD ableiten (Abb. 19, 20).

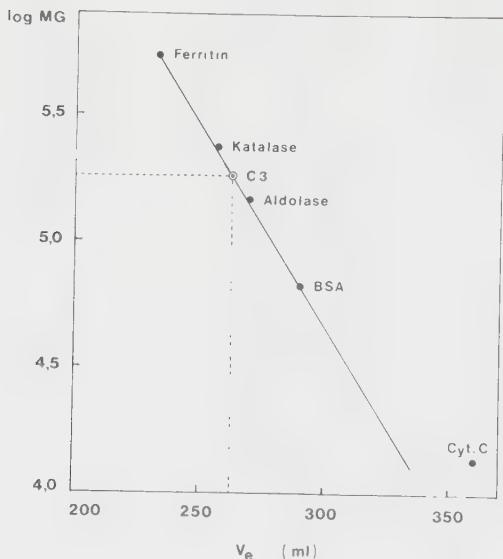


Abb. 19 Molekulargewichtsbestimmung von C3 mit Sephacryl S 300

2.3. Charakterisierung der Untereinheiten von C3 und C5 in der Natriumdodecylsulfat (SDS) - Gelelektrophorese

Die nativen Komplementproteine C3 und C5 sind jeweils aus einer α - und β -Polypeptidkette aufgebaut, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (74). Zur

Untersuchung dieser Untereinheiten von C3 und C5 mußten daher reduzierende Bedingungen angewandt werden. Die Molekulargewichtsbestimmung der α - und β -Polypeptidketten und die Stabilität dieser Ketten unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen waren Gegenstand der folgenden Untersuchung.

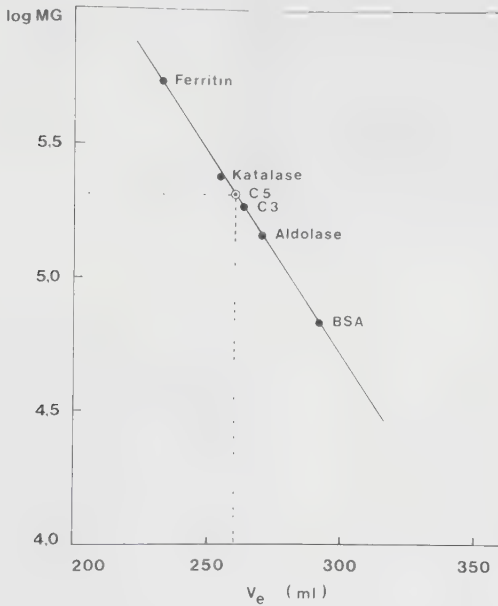


Abb. 20 Molekulargewichtsbestimmung von C5 mit Sephacryl S 300

2.3.1. Untereinheiten von C3

Das C3 Protein (1 mg/ml) wurde in Tris/HCl-Puffer (100 mM; pH 8,0) in Anwesenheit von SDS (1%), Harnstoff (4 M) und DTT (40 mM) reduziert und denaturiert. Die Inkubation erfolgte entweder bei 37°C für 30 min oder bei 100°C für 5 min.

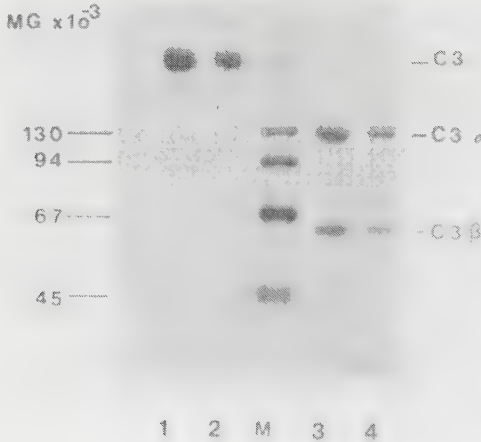


Abb. 21 a

Bahn:

1. 20 µg Protein (C3)
2. 10 µg Protein (C3)
3. 20 µg Protein (C3), reduziert
4. 10 µg Protein (C3), reduziert
- M. Referenzproteine, je 10 µg, reduziert (wie in Legende zu Abb. 9)

Abb. 21 b

Bahn:

1. 10 µg Protein (C3)
2. 20 µg Protein (C3)
3. 10 µg Protein (C3), reduziert
4. 20 µg Protein (C3), reduziert

M. Referenzproteine, je 10 µg, reduziert (wie in Legende zu Abb. 9)

A-D: Denaturierungsprodukte von C3

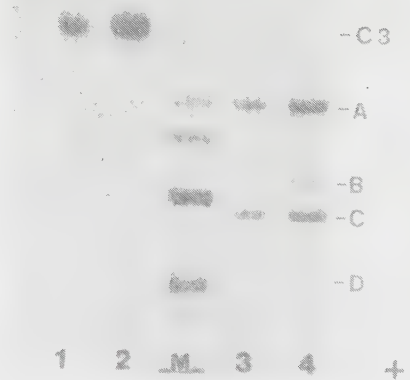


Abb. 21 SDS-Elektrophorese von gereinigtem C3 in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel

a. Denaturierung der Proteinproben bei 37°C für 30 min

b. Denaturierung der Proteinproben bei 100°C für 5 min

Nach dem Abkühlen wurden alle Proben bei Zimmertemperatur 20 min mit Jodacetamid (20 mM) alkyliert und auf das Gel aufgetragen (s. Methoden 10.1.). Die Ergebnisse sind in den vorangehenden Abbildungen 21 a und 21 b dargestellt. Unter milden Denaturierungsbedingungen (30 min bei 37°C) erfolgte die vollständige Aufspaltung von C3 in zwei Polypeptidketten (Abb. 21 a). Wurde aber die Denaturierung unter extremen Bedingungen (5 min bei 100°C) durchgeführt, konnten nach unspezifischer Proteinfärbung vier Banden identifiziert werden (Abb. 21 b). Die Molekulargewichte dieser vier reduzierten Denaturierungsprodukte von C3 wurden nach Gelelektrophorese in einem 10%igen Polyacrylamid-SDS-Gel mit 120 KD (A); 72 KD (B); 62,3 KD (C) und 47,7 KD (D) anhand der in Abb. 22 wiedergegebenen Eichgeraden bestimmt.

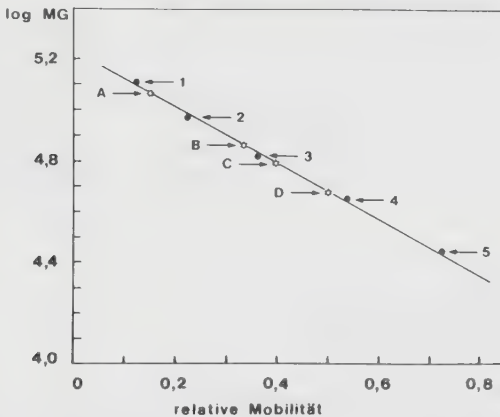


Abb. 22 Bestimmung von Anzahl und Größe der Denaturierungsprodukte von gereinigtem C3 aus Meerschweinchenserum durch SDS Gelelektrophorese

A-D: Denaturierungsprodukte von C3

Referenzproteine: 1. β -Galactosidase (130 KD); 2. Phosphorylase-A (94 KD); 3. Rinderserumalbumin (67 KD); 4. Ovalbumin (45 KD); 5. Carbonic-Anhydrase (27 KD)

Die Protein-Banden mit den Molekulargewichten von 120 KD und 62,3 KD entsprachen in ihrer Größe der α - und β -Polypeptidkette von C3. Die zusätzlichen Banden (72 KD $\hat{=}$ B und 47,7 KD $\hat{=}$ D) unter extremen Denaturierungsbedingungen kamen durch eine Spaltung der α -Kette (120 KD $\hat{=}$ A) zustande, wie sich im folgenden Experiment zeigen ließ.

Radioaktiv markiertes ^{14}C -C3 wurde in diesem Versuch in verschiedenen Puffersystemen denaturiert und anschließend in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach unspezifischer Proteinfärbung des Gels wurden die einzelnen Gelstücke in H_2O_2 aufgelöst. Die prozentuale Verteilung der eingesetzten Radioaktivität auf die einzelnen Banden ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tab. 6 Einfluß der Denaturierungsbedingungen auf den Zerfall der α -Kette von C3

Denaturierungs- bedingungen (pH-Wert / Temperatur)	Radioaktivität (%) der Denaturierungs- produkte von C3			
	A (120 KD)	B (72 KD)	C (62,3 KD)	D (47,7 KD)
pH 8,0 / 37°C	64	-	39	-
pH 7,0 / 100°C	52	9	38	4
pH 8,0 / 100°C	47	11	37	5
pH 10,0 / 100°C	43	14	38	8

Radioaktives C3 (1 mg/ml) wurde in Tris (100 mM; pH 7,0-10,0) für 30 min bei 37°C oder für 5 min bei 100°C denaturiert. Je 20 μg Protein ($6,02 \times 10^4$ dpm $\hat{=}$ 100 %) wurden auf ein Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die prozentuale Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Banden bestimmt. Die Wiederfindungsrate der Gesamtaktivität betrug 83%.

Dieser Versuch zeigte, daß die α -Kette von C3 (120 KD) in Abhängigkeit vom pH-Wert des Denaturierungspuffers und der Inkubationstemperatur zum Teil in zwei Peptidketten mit den

Molekulargewichten von 72 KD und 47,7 KD zerfallen konnte.

2.3.2. Untereinheiten von C5

Zur Analyse der Untereinheiten von C5 wurde Denaturierungspuffer (100 mM Tris/HCl; pH 8,0 / 1% SDS / 40 mM DTT) mit oder ohne Zusatz von Harnstoff (4 M) eingesetzt. Alle Proben wurden bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend bei Zimmertemperatur für 20 min mit Jodacetamid (20 mM) alkyliert. Die Elektrophorese von C5 in Denaturierungspuffer ohne Harnstoff zeigte, daß das Protein im reduzierten Zustand in drei Polypeptidketten aufgespalten wurde (Abb. 23 a). Im nicht-reduzierten Zustand war nur eine Proteinbande erkennbar. Erfolgte dagegen die Inkubation des Proteins in Gegenwart von Harnstoff, wurden nach Reduktion und anschließender Elektrophorese zwischen den zwei Hauptbanden (α - und β -Kette) zwei schwächer gefärbte Banden in enger Nachbarschaft sichtbar (Abb. 23 b). Auch das nichtreduzierte Protein wurde in Gegenwart von Harnstoff verändert, da neben der Hauptbande zwei kleinere Nebenbanden auftraten.

Abb. 23 a

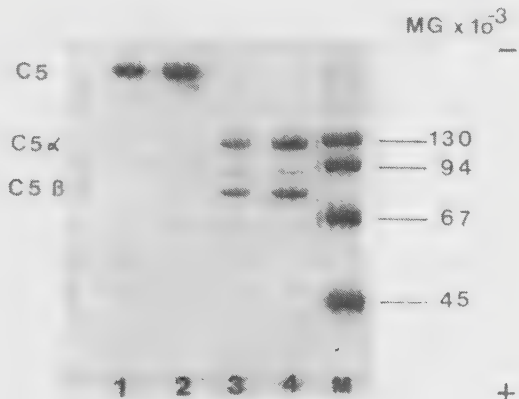


Abb. 23 b

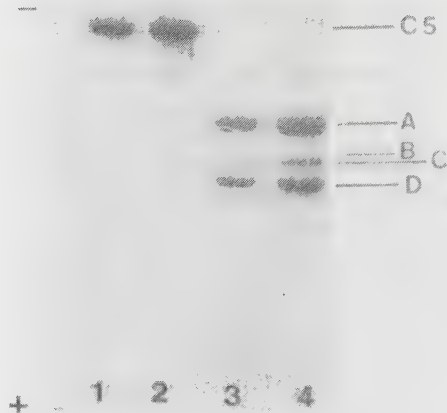


Abb. 23 SDS-Elektrophorese von gereinigtem C5 in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel

Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte in Abwesenheit (Abb. 23 a) und in Anwesenheit (Abb. 23 b) von Harnstoff (4 M) für 30 min bei 37°C.

Bahn:

1. 10 µg Protein (C5)
2. 20 µg Protein (C5)
3. 10 µg Protein (C5), reduziert
4. 20 µg Protein (C5), reduziert
- M. Referenzproteine, je 10 µg, reduziert (wie in Legende zu Abb. 9)

A-D: Denaturierungsprodukte von C5

Die Molekulargewichte der vier reduzierten Denaturierungsprodukte von C5 wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel mit 122 KD (A; α -Kette); 86 KD (B); 82,2 KD (C) und 77,6 KD (D; β -Kette) ermittelt. Diese Bestimmung erfolgte anhand einer Eichgeraden aus Proteinmarkern mit bekanntem Molekulargewicht (Abb. 24).

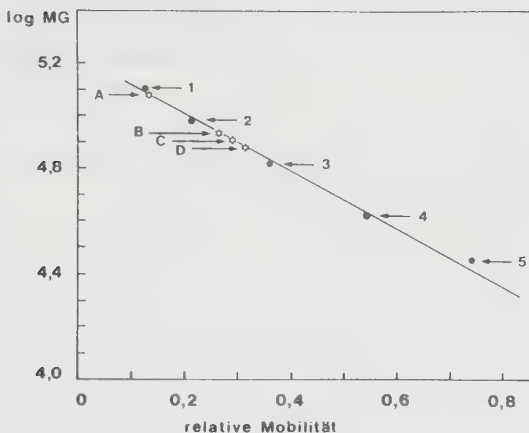


Abb. 24 Bestimmung von Anzahl und Größe der Denaturierungsprodukte von gereinigtem C5 durch SDS-Gelelektrophorese

A-D: Denaturierungsprodukte von C5

1-5: Referenzproteine mit bekanntem MG (s. Legende zu Abb. 22)

Für C5 ließ sich kein direkter Nachweis dafür erbringen, daß die Peptidketten B und C zwischen der α - und β -Kette Spaltprodukte aus der α -Kette sind. Untersuchungen mit ^{14}C -C5 analog dem für ^{14}C -C3 in Tabelle 6 zusammengefaßten Verfahren zeigten, daß ca. 10-12 % der eingesetzten Radioaktivität in den beiden Peptidketten zwischen der α - und β -Kette vorhanden waren. Dieser Wert war für drei verschiedene C5-Präparationen konstant.

3. Hemmwirkung von Lipopolysacchariden (LPS) auf die hämolytische Aktivität der gereinigten Komplementkomponenten C3 und C5

3.1. Hemmung der hämolytischen C3-Aktivität durch LPS von *Yersinia enterocolitica* 75 (Ye 75)

In diesen Experimenten wurde der Einfluß von LPS-Präparaten auf die hämolytische C3-Aktivität untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten gereinigtes C3 und LPS, welches entweder von einer Rauform (LPS-R) oder von einer Glattform (LPS-S) von *Yersinia enterocolitica* (Ye 75) gewonnen worden war. Nach einer Inkubationsphase von 20 Stunden bei 4°C wurde die hämolytische C3-Aktivität bestimmt (Abb. 25).

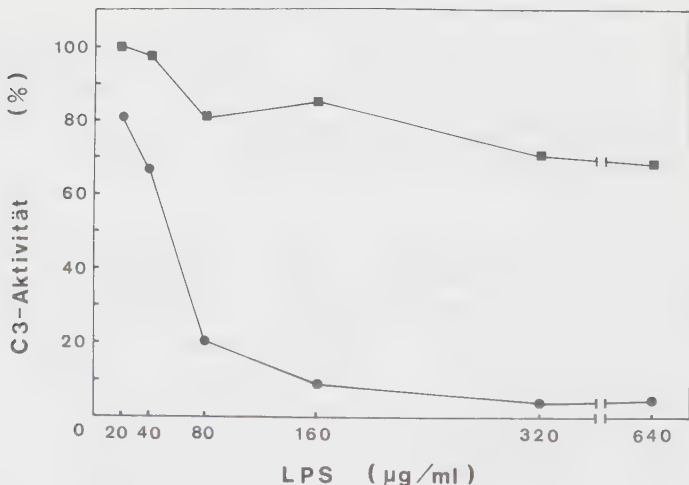


Abb. 25 Hemmung der C3-Aktivität durch LPS-R und LPS-S von Ye 75

Inkubation von C3 (4 µg/ml = $1,36 \times 10^8$ eff. Mol./ml) in VBS⁺⁺ + 4,5 mM Ca⁺⁺ mit LPS-R (●—●) und LPS-S (■—■) für 20 h bei 4°C. Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

In diesen Versuchen wurde eine dosisabhängige Hemmung der C3-Aktivität in Gegenwart von LPS-R gefunden. Eine starke Inhibition der eingesetzten C3-Aktivität ($1,36 \times 10^8$ eff.Mol./ml) war ab einer LPS-R Konzentration von 80 µg/ml festzustellen. Demgegenüber konnte unter identischen Versuchsbedingungen mit dem LPS-S nur ein minimaler Hemmeffekt beobachtet werden (Abb. 25). Diese Ergebnisse bestätigten die Befunde von BRADE und KREUZPAINTNER (70), welche unter den gleichen Reaktionsbedingungen erhoben worden waren. In weiterführenden Untersuchungen stellte sich die Frage, ob veränderte Reaktionsbedingungen im Testansatz das Versuchsergebnis beeinflussen konnten.

3.2. Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Hemmung von hämolytischem C3 durch LPS-R und LPS-S von Ye 75

3.2.1. Inkubationstemperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktion zwischen C3 und LPS zeigt Abb. 26. Die stärksten Hemmeffekte auf C3 wurden für LPS-R in einem Temperaturbereich zwischen 4°C und 10°C erzielt, wobei aber auch bei höheren Temperaturen eine ausgeprägte Inhibition der C3-Aktivität gegeben war. Einen vergleichsweise schwachen Effekt hatte dagegen das LPS-S. Bei höheren Temperaturen deutete sich für LPS-S eine stärkere Hemmwirkung auf das eingesetzte C3 an.

3.2.2. pH-Wert

Lipopolysaccharide sind Makromoleküle, deren elektrochemische Ladung und physikalischer Zustand durch ihren Gehalt an Phosphat, Pyrophosphat, Carboxylgruppen und basischen Ionen bestimmt wird (81, 82). Es sollte untersucht werden, ob durch Ladungsveränderung des LPS bei verschiedenen pH-Werten die Reaktion mit C3 beeinflusst werden konnte. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.

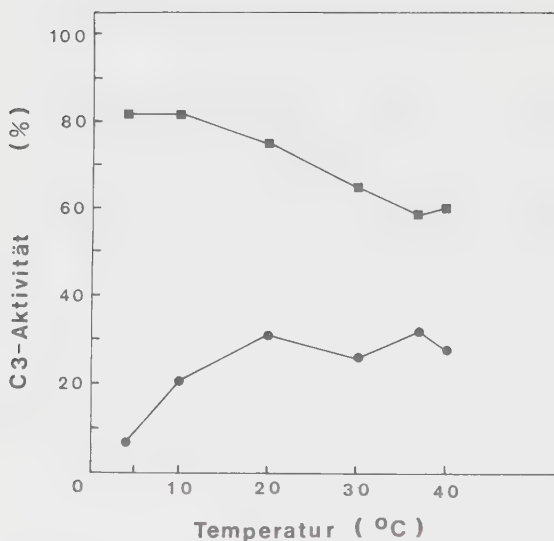


Abb. 26 Hemmung der C3-Aktivität durch LPS-R und LPS-S von Ye 75 bei verschiedenen Temperaturen

LPS-S (Ye 75) ■ — ■ LPS-R (Ye 75) ● — ●

Inkubations- und Reaktionsbedingungen wie in Legende zu Abb.25
 C3 eingesetzt: 4 µg/ml ($1,82 \times 10^8$ eff.Mol./ml $\hat{=}$ 100%)
 LPS eingesetzt: 160 µg/ml

Für die Reaktion zwischen C3 und LPS-R ließ sich maximale Inhibition der C3-Aktivität im Bereich alkalischer pH-Werte ($>7,5$) nachweisen, während pH-Werte im sauren Bereich den Reaktionsablauf hemmten. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß Struktur und Ladungszustand von LPS-R dessen Reaktionsfähigkeit mit C3 stark beeinflussen. Im Gegensatz dazu zeigte LPS-S bei keinem pH-Wert stärkere Hemmwirkung auf die C3-Aktivität (Abb. 27).

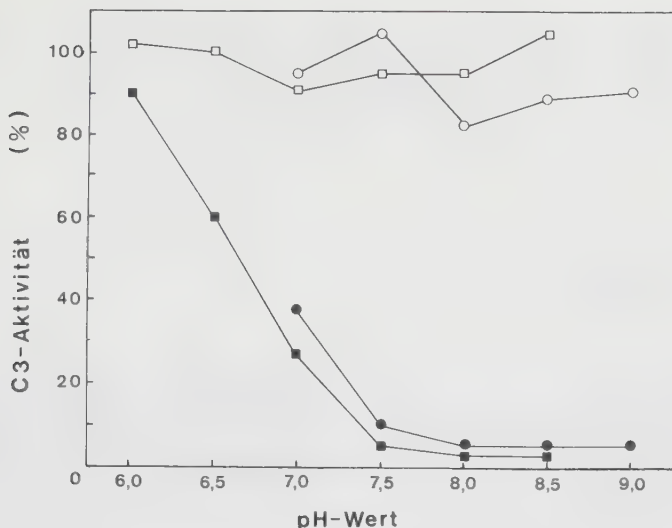


Abb. 27 Hemmung der C3-Aktivität durch LPS-R und LPS-S von Ye 75 bei verschiedenen pH-Werten

25 mM Veronal/HCl + 4,5 mM Ca^{++} } LPS-S (○—○)
 } LPS-R (●—●)
 25 mM Tris/Maleat + 4,5 mM Ca^{++} } LPS-S (□—□)
 } LPS-R (■—■)

Inkubation von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \approx 1,85 \times 10^8 \text{ eff. Mol./ml}$) für 20 h bei 4°C mit $160 \mu\text{g/ml}$ LPS-R und LPS-S in zwei Puffersystemen bei verschiedenen pH-Werten. Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

3.2.3. Ionenstärke

Die Versuche zur Reaktion von C3 mit LPS bei verschiedenen Ionenstärken erfolgten in Veronalpuffer (5 mM Veronal/HCl + $4,5 \text{ mM } \text{Ca}^{++}$; pH 7,3) mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0-750 mM). Die Ergebnisse wurden in Abb. 28 zusammengefaßt. LPS-R hemmte die C3-Aktivität in Gegenwart aller getesteten

Salzkonzentrationen. Eine maximale Inhibition (>90%) war in einem Bereich von 50-300 mM NaCl-Zusatz gegeben. In Gegenwart von LPS-S trat auch unter den hier getesteten Versuchsbedingungen keine Hemmung von hämolytischem C3 auf.

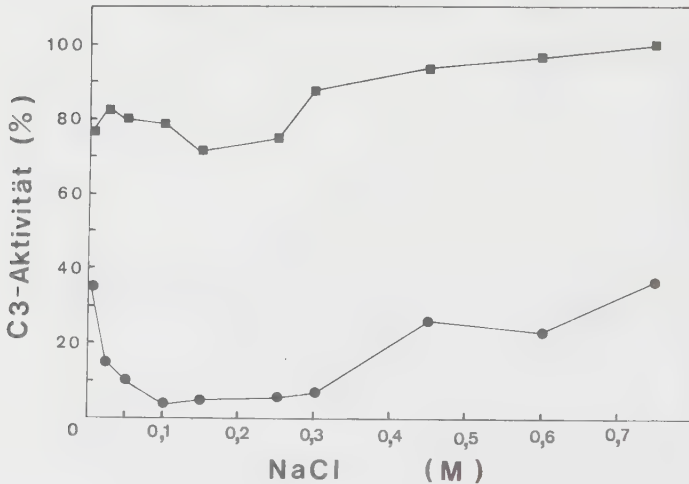


Abb. 28 Hemmung der C3-Aktivität durch LPS-R und LPS-S von Ye 75 bei verschiedenen Ionenstärken

Inkubation von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,72 \times 10^8 \text{ eff. Mol./ml}$) mit $160 \mu\text{g/ml}$ LPS-R (●—●) und $160 \mu\text{g/ml}$ LPS-S (■—■) für 20 h bei 4°C . Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

Die unter den Abschnitten 3.2.1. - 3.2.3. beschriebenen Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu:

- (1) pH und Ionenstärke des Veronalpuffers sind bei weiteren Untersuchungen über die Reaktion von LPS-R und C3 gut geeignet.
- (2) Eine Ionenbindung zwischen den Reaktionspartnern LPS-R und C3 ist vermutlich nicht für die Hemmwirkung verantwortlich.
- (3) LPS-S zeigt ein grundsätzlich anderes Reaktionsvermögen als LPS-R.

3.3. Bedeutung des Aggregationszustandes von LPS-R und LPS-S von Ye 75 bei deren Reaktion mit C3

3.3.1. Elektronenoptische Darstellung verschiedener Aggregationszustände

Die Veränderungen des Aggregationszustandes der LPS-Präparationen von Ye 75 S und Ye 75 R durch die Gegenwart von Triethylamin, divalenten Kationen (Ca^{++}) und C3 wurde anhand von elektronenoptischen Aufnahmen verfolgt.

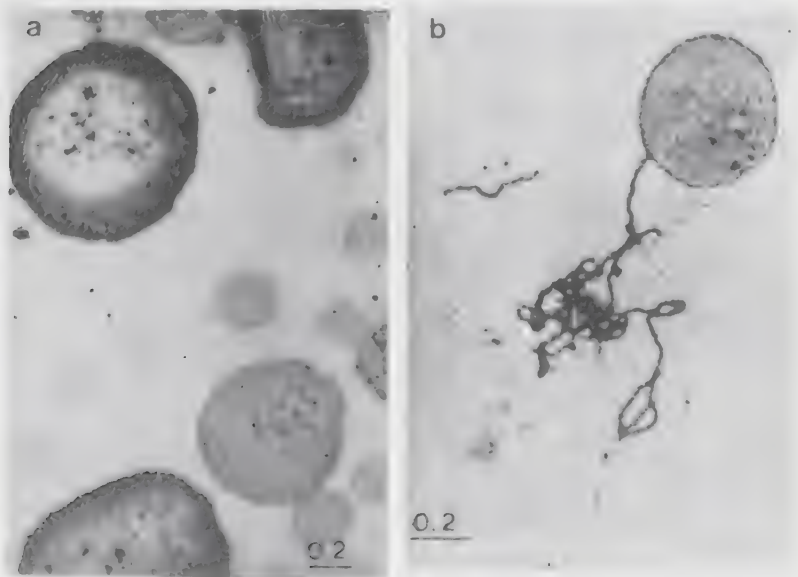


Abb. 29 Darstellung des LPS-S und LPS-R von Ye 75

Die LPS-Präparationen von (a) Ye 75 S und (b) Ye 75 R wurden in H_2O bidest. gelöst (2 mg/ml), in VBS⁻⁻⁻-Puffer verdünnt (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und ohne weitere Vorbehandlung elektronenoptisch untersucht.

Angaben zur Fixierung siehe Methoden (18.).
Alle Dimensionen wurden in μm dargestellt.

Abbildung 29 stellt die Struktur der unbehandelten LPS-Präparationen dar. Das LPS-S bildete große, stark strukturierte Mizellen. Einzelstrangformen waren nie zu erkennen. In der LPS-Präparation von Ye 75 R waren deutlich Einzelstränge zu sehen, die dann teilweise in Gebilde mit rundem bis ovalem Umriss übergingen. Die Triethylamin (-TEA-) Behandlung (10 mM) der LPS-Präparationen führte zu einer Zerstörung dieser Strukturen. LPS-R erschien in Form von kleinen, relativ homogenen Kugeln (Abb. 30 b), während das LPS-S weit verzweigte Netzformationen ausbildete (Abb. 30 a).

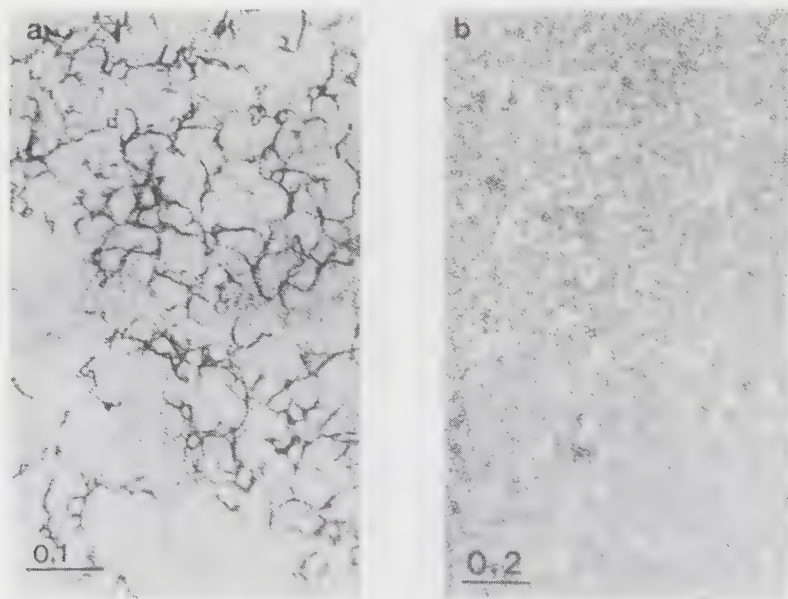


Abb. 30 Darstellung des LPS-S und LPS-R von Ye 75 nach Behandlung mit Triethylamin (TEA)

a) LPS-S (Ye 75)

b) LPS-R (Ye 75)

Die Inkubation des LPS (2 mg/ml) mit TEA (10 mM) erfolgte für 2 h bei 4°C in H₂O bidest.. Überschüssiges TEA wurde durch Dialyse gegen H₂O bidest. entfernt. 160 µg LPS/ml wurden in VBS--Puffer aufgenommen.

Die Inkubation der TEA-behandelten LPS-Präparationen in Gegenwart von Ca^{++} (4,5 mM) ließ im elektronenoptischen Bild eine Reassoziations der LPS-Stränge erkennen (Abb. 31). Sowohl das LPS der Glattform wie auch das LPS der Rauhform zeigte eine deutliche Ausbildung von definierten LPS-Strängen.

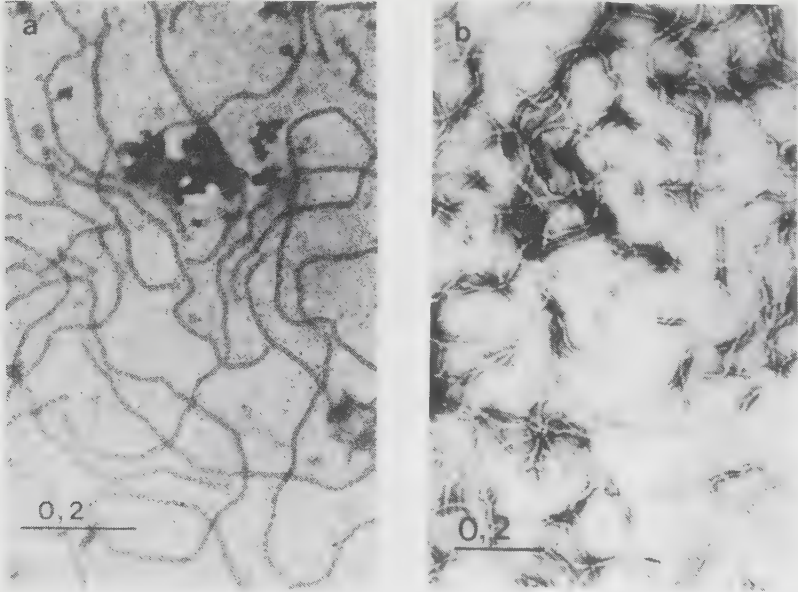


Abb. 31 Darstellung des LPS-S und LPS-R von Ye 75 nach TEA-Behandlung und weiterer Inkubation in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen

a) LPS-S (Ye 75)

b) LPS-R (Ye 75)

Die Aufbereitung des LPS erfolgte entsprechend den Angaben unter Abb. 30. LPS (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde bei 4°C für 12 h in VBS⁺⁺-Puffer + 4,5 mM Ca^{++} inkubiert.

Erfolgte aber die Inkubation (12 h bei 4°C) zusätzlich zum Ca^{++} noch in Gegenwart von C3 (4 µg/ml), so wurde die Reassoziaton des solubilisierten LPS zu Einzelsträngen deutlich vermindert. Die jetzt auftretenden Strukturen (Abb. 32) glichen den in Abbildung 30 dargestellten kleinen Kugeln (LPS-R) bzw. Netzformationen (LPS-S).

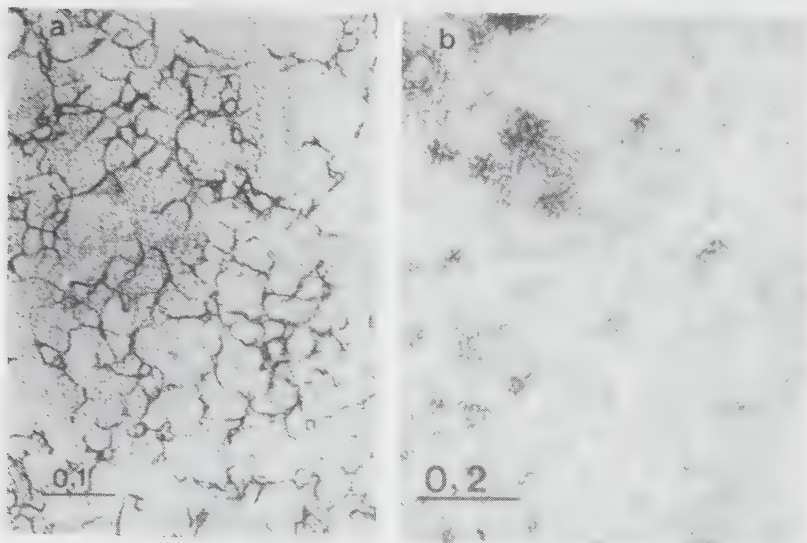


Abb. 32 Darstellung des LPS-S und LPS-R von Ye 75 nach TEA-Behandlung und weiterer Inkubation in Gegenwart von Ca^{++} und C3

a) LPS-S (Ye 75)

b) LPS-R (Ye 75)

Die Aufbereitung des LPS erfolgte entsprechend den Angaben unter Abb. 30. Die Inkubation des LPS (160 µg/ml) mit C3 (4 µg/ml) wurde bei 4°C für 12 h in VBS^{--} -Puffer + 4,5 mM Ca^{++} vorgenommen.

3.3.2. Einfluß von Triethylamin und Lagerung auf die Reaktivität von LPS

LPS-Präparationen von Ye 75 R und Ye 75 S wurden durch Behandlung mit TEA in ihrem aktuellen physikalischen Zustand verändert. TEA verursacht eine Desaggregation der LPS-Moleküle. Der so erzielten höheren Löslichkeit des LPS in wässrigem Medium steht die Wirkung von divalenten Kationen entgegen. Kationen wie Ca^{++} oder Mg^{++} , und auch längere Aufbewahrung bei 4°C , führen zu einer Reaggregation der LPS-Stränge (82). Inwieweit nun Veränderungen im physikalischen Zustand die Reaktion von LPS mit hämolytisch aktivem C3 beeinflussen, sollte in den folgenden Versuchen geprüft werden.

Die LPS-Präparationen wurden zunächst mit steigenden Konzentrationen (0-50 mM) an TEA behandelt (vergl. Methoden 1.2.). Unmittelbar nach Rekonstitution erfolgte die Inkubation mit C3 in Veronalpuffer mit oder ohne Ca^{++} -Zusatz (Abb. 33 a). Die gleichen TEA-behandelten LPS-Präparationen wurden unter identischen Versuchsbedingungen nach 6 Tagen Lagerung bei 4°C (Abb. 33 b) und nach Gefrieren bei -70°C (Abb. 33 c) auf ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber C3 untersucht. Aus der Darstellung in Abb. 33 ist ersichtlich, daß LPS-R die C3-Aktivität unabhängig von der Triethylaminbehandlung und den Lagerungsbedingungen hemmte. Die Reaktion war aber nur in Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen möglich. Dies Ergebnis weist auf einen direkten Zusammenhang zwischen Ca^{++} -induzierter Aggregation des LPS-R und Hemmwirkung auf C3 hin (vergl. 3.3.1.). Für das LPS-S konnte erstmals eine Interaktion mit C3 gezeigt werden, die analog dem LPS-R zu einem Verlust der C3-Aktivität führte (Abb. 33 a). LPS-S erwies sich aber nur nach vorheriger Triethylaminbehandlung als reaktiv. In Abwesenheit von Ca^{++} war eine signifikante Abhängigkeit von der Triethylaminkonzentration für die Reaktion von LPS-S mit C3 deutlich.

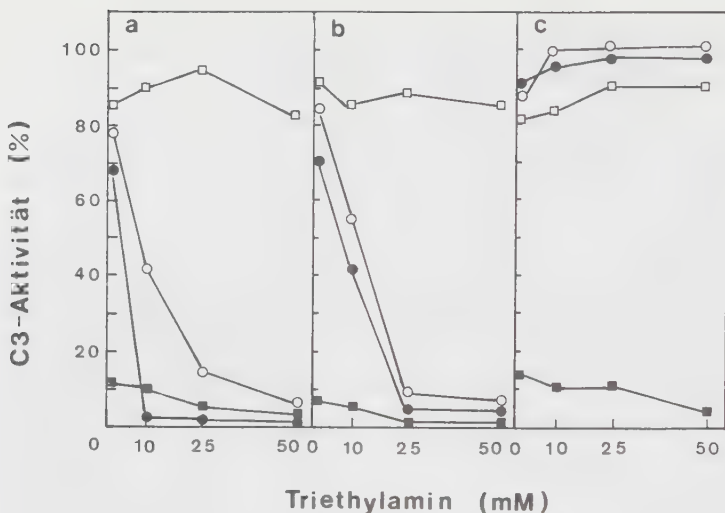


Abb. 33 Einfluß von Triethylamin und Lagerung auf die Reaktivität von LPS-R und LPS-S von Ye 75

Inkubation von C3 (4 µg/ml $\hat{=}$ 1,62-1,87 eff. Mol./ml) mit 160 µg/ml LPS für 12 h bei 4°C in VBS⁻⁻⁻ mit 4,5 mM Ca⁺⁺ (LPS-R ■—■; LPS-S ●—●) und ohne Ca⁺⁺ (LPS-R □—□; LPS-S ○—○).

Abb.: a. LPS-frisch; b. LPS nach Lagerung bei 4°C; c. LPS nach Lagerung bei -70°C. Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde jeweils nach Inkubation im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

Die Überführung des LPS-S zur niedermolekularen Form durch TEA-Behandlung war somit ausreichend, um die Reaktion mit C3 zu katalysieren. Erfolgte die Inkubation in Gegenwart von Ca⁺⁺, ergab sich eine zusätzliche Erhöhung der Reaktivität für das LPS-S. Lagerung von solubilisiertem LPS-S bei 4°C reduzierte die Reaktionsfähigkeit von LPS-S gegenüber C3 (Abb. 33 b), und Gefrieren bei -70°C ergab sogar eine vollständige Aufhebung der Reaktion (Abb. 33 c). Am Beispiel des LPS-S ließ sich in diesen Versuchen zeigen, daß Aufbereitung

und Aufbewahrung dessen Reaktionsvermögen mit C3 entscheidend beeinflussen können.

3.3.3. Einfluß von divalenten Kationen auf die Reaktivität von LPS

Auf die entscheidende Bedeutung von Kationen für die Reaktion von LPS-R (Ye 75) mit C3 wiesen schon frühere Experimente hin (Abb. 33). In weiteren Experimenten wurde der Einfluß anderer divalenter Kationen in Abhängigkeit von der Konzentration auf die Reaktion von LPS-R mit C3 untersucht (Abb. 34).

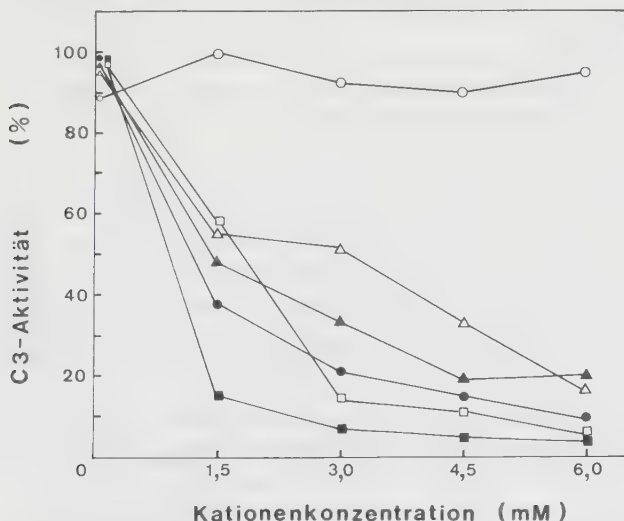


Abb. 34 Hemmung der C3-Aktivität durch LPS-R von Ye 75 in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener divalenter Kationen

Inkubation von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,1 \times 10^8 \text{ eff. Mol./ml}$) in VBS^{--} mit $160 \mu\text{g LPS-R/ml}$ für 12 h bei 4°C . Die Kationen Mg^{++} ○—○; Ca^{++} ●—●; Sr^{++} △—△; Ba^{++} ▲—▲; Mn^{++} □—□ und Co^{++} ■—■ wurden als Chloride zugesetzt. Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

Alle getesteten Kationen außer Mg^{++} katalysierten in nahezu äquimolaren Mengen die Inaktivierung von C3 durch LPS-R. Ohne zweiwertige Kationen oder in Gegenwart chelatisierender Agenzien (EDTA; Experiment nicht dargestellt) war keine Reaktion feststellbar. Als Ergebnis stand somit fest, daß der Grad der C3-Inaktivierung weitgehend von der Kationenkonzentration bestimmt wurde, wobei 4,5 mM Ionen-Zusatz maximale Inhibition gewährleistete. Ferner wird aus Abb. 34 deutlich, daß die Reaktion sowohl durch Kationen mit kleinem Ionenradius und hoher Ladungsdichte (Ca, Mn, Co - 0,99; 0,8; 0,74 Å) als auch durch größere Kationen (Ba, Sr - 1,35; 1,13 Å) katalysiert wurde, und somit keine direkte Spezifität für ein bestimmtes Kation vorlag. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnte nicht geklärt werden, warum Mg^{++} keine katalytischen Eigenschaften aufwies.

Die Abhängigkeit der Reaktion von divalenten Kationen wurde auch in einem weiteren Experiment deutlich, in welchem zwei Fragen beantwortet werden sollten.

1. Wie wirkt sich die Präinkubation von LPS-R mit divalenten Kationen auf die Reaktion mit später zugesetztem C3 aus?
2. Führt diese Präinkubation zu einem stabilen reaktiven LPS-R?

Die Ergebnisse dieser Experimente wurden in Abb. 35 zusammengefaßt. Es ist ersichtlich, daß die Präinkubation von LPS-R mit Ca^{++} -Ionen (4,5 mM) ein reaktionsfähiges LPS-Präparat ergab, welches die eingesetzte C3-Aktivität vollständig hemmen konnte. Die Dialyse dieses Ca^{++} -gesättigten LPS-R gegen VBS⁻⁻⁻-Puffer führte aber zu einem fortschreitenden Verlust der Reaktionsfähigkeit. Der durch Kationen vermittelte reaktive Zustand des LPS-R war reversibel und konnte durch erneute Ca^{++} -Zugabe wieder hergestellt werden.

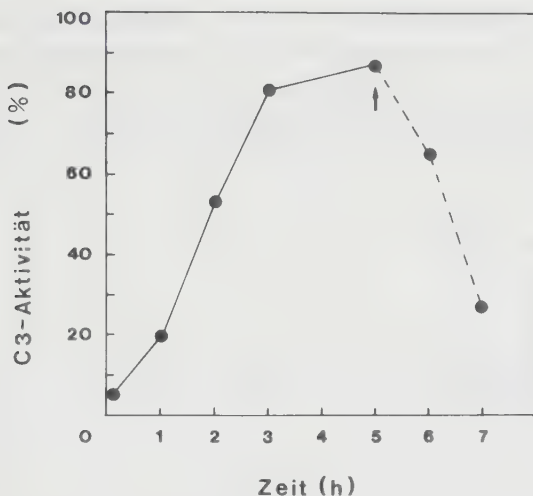


Abb. 35 Die Reaktivität von Ca^{++} -gesättigtem LPS-R von Ye 75 nach Dialyse gegen VBS^{--} -Puffer

Versuchsansatz: 3 ml LPS-R (2 mg/ml) wurden 20 h bei 4°C gegen 300 ml VBS^{--} + 4,5 mM Ca^{++} dialysiert. Danach erfolgte erneute Dialyse gegen VBS^{--} (300 ml). Zu den Testzeiten (Abszisse) wurden jeweils Aliquots von 80 μl LPS-R (160 μg) entnommen und mit C3 (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in VBS^{--} für 20 h bei 4°C inkubiert. Die prozentuale Restaktivität wurde im Vergleich zu einem Testansatz ohne LPS ermittelt. Der Pfeil ($\uparrow$) markiert einen erneuten Pufferwechsel zu VBS^{--} + 4,5 mM Ca^{++} .

3.4. Analyse des Reaktionsablaufes bei der Inaktivierung von hämolytischen C3 durch LPS-R und LPS-S von Ye 75

3.4.1. Reaktionskinetik

In den vorangegangenen Versuchen wurden die Reaktionsbedingungen ermittelt, die eine starke Hemmung der C3-Aktivität mit den jeweiligen LPS-Präparationen gewährleisteten. Die Kinetik dieses Inaktivierungsprozesses unter optimalen

Inkubationsbedingungen wurde in weiteren Experimenten untersucht. Die Inaktivierungskinetiken in Gegenwart von LPS-S oder LPS-R waren sehr ähnlich (Abb. 36). Eine 50%ige Hemmung der eingesetzten C3-Aktivität wurde mit dem LPS-S allerdings bereits nach 78 min, mit dem LPS-R aber erst nach 170 min erreicht.

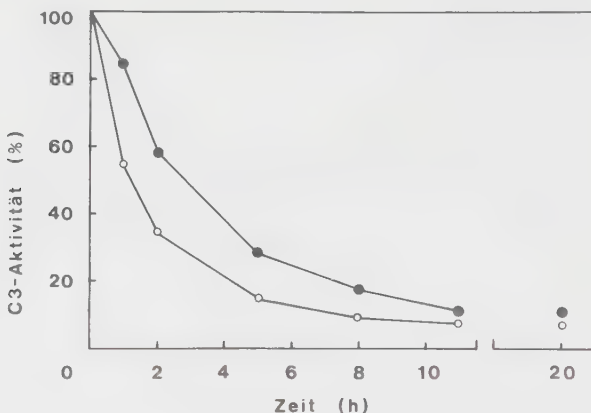


Abb. 36 Kinetik der C3-Inaktivierung durch LPS-R und LPS-S von Ye 75

LPS-R (Ye 75) ● — ●

LPS-S (Ye 75) ○ — ○

Inkubation von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,8 \times 10^8 \text{ eff. Mol./ml}$) in VBS⁻⁻⁻ + $4,5 \text{ mM Ca}^{++}$ mit $160 \mu\text{g LPS/ml}$ bei 4°C . Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde im Vergleich zu einer Kontrolle ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

Mit einer Erhöhung der Inkubationstemperatur konnte eine leichte Beschleunigung des Reaktionsablaufes beobachtet werden (Tab. 7).

Tab. 7 Inaktivierung von C3 durch LPS-R und LPS-S von Ye 75
in Abhängigkeit von der Temperatur

Reaktions- ansätze	Inkubationszeiten (min) für 50%ige Hemmung der C3-Aktivität bei verschiedenen Temperaturen			
	<u>4°C</u>	<u>10°C</u>	<u>20°C</u>	<u>37°C</u>
LPS-S + C3	78	73	65	59
LPS-R + C3	170	155	147	133

Inkubation von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,2 \times 10^8 \text{ eff.Mol./ml}$) in VBS⁺⁺ + 4,5 mM Ca⁺⁺ mit 160 μg LPS/ml. Die Menge an hämolytisch aktivem C3 wurde im Vergleich zu einer Kontrolle ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

Für die künftigen Experimente wurde die Reaktionstemperatur von 4°C beibehalten, um möglichst spontane Inaktivierung des Proteins auszuschließen. Die Inkubationszeit betrug dann in der Regel 12 Stunden.

Unter diesen Bedingungen der Kälteinkubation war der Ablauf der C3-Inaktivierung eine Funktion der LPS-Konzentration. In Tabelle 8 wurden die Inkubationszeiten für eine 50%ige Hemmung der eingesetzten C3-Aktivität ($1,2 \times 10^8 \text{ eff.Mol./ml}$) bei verschiedenen LPS-Konzentrationen zusammengefaßt.

Tab. 8 Inaktivierung von C3 in Abhängigkeit von der LPS-Konzentration

LPS-Konzentration im Reaktionsansatz (μg / ml)	Inkubationszeiten (min) für 50%ige Hemmung der C3-Aktivität durch LPS:	
	LPS-S	LPS-R
80	172	408
160	81	210
320	52	126
640	28	72

Inkubation und Versuchsansatz siehe Legende zu Tab. 7

Von noch größerer Bedeutung für die Reaktionsgeschwindigkeit war die chemische Modifikation des LPS durch TEA. In Tabelle 9 wurden die Ergebnisse einer Versuchsreihe zusammengefaßt, in der die LPS-Präparationen mit verschiedenen Konzentrationen an TEA (0-150 mM) aufbereitet und dann zur Reaktion mit C3 eingesetzt worden waren. Es wird deutlich, daß die Aufbereitung des LPS mit TEA die Reaktion stark beschleunigte und schon innerhalb von 60 min bereits maximale Inhibition der eingesetzten C3-Aktivität auftrat. Die hierfür erforderliche Triethylaminkonzentration lag für das LPS-S bei 50 mM und für das LPS-R bei 100 mM. Weitere Ergebnisse über die Inaktivierungskapazität von LPS in Abhängigkeit von Triethylaminkonzentration führten aber dazu, daß die LPS-Präparate auch weiterhin mit 10 mM Triethylamin aufbereitet wurden (s. Abschnitt 3.4.2.).

Tab. 9 C3-Inaktivierung in Abhängigkeit von der Aufbereitung des LPS-S und LPS-R von Ye 75 mit verschiedenen Triethylaminkonzentrationen

Triethylaminkonzentration bei der Aufbereitung von LPS	C3-inaktiviert (%) nach Inkubation (60 min) mit LPS:	
	(mM)	
	LPS-S	LPS-R
0	2	17
10	41	25
25	81	49
50	92	78
100	96	89
150	95	90

Versuchsansatz wie in Legende zu Tab.7; Inkubationsdauer : 60 min; C3 eingesetzt: 4 µg/ml ($1,32 \times 10^8$ eff.Mol./ml $\hat{=}$ 100%)

3.4.2. Inaktivierungskapazität

In den folgenden Experimenten sollte die Inaktivierungskapazität einer konstanten LPS-Menge (160 µg/ml) bestimmt werden. Die eingesetzten C3-Konzentrationen wurden hierzu in einem Bereich zwischen $1,2 \times 10^8$ eff.Mol./ml und $7,2 \times 10^9$ eff.Mol./ml variiert. Die mit beiden LPS-Präparationen ermittelten Ergebnisse wurden in Abb. 37 dargestellt. Für das LPS-S konnte eine totale Inaktivierungskapazität für ca. 3×10^8 eff.Mol./ml bestimmt werden. Mit dieser C3-Konzentration war eine Sättigung des LPS-S erreicht, so daß auch bei Erhöhung der angebotenen C3-Menge dieser Wert konstant blieb. Deutlich anders verhielt sich das LPS-R. Vollständige Inhibition war auch hier zunächst bis zu $2,2 \times 10^8$ eff.Mol./ml gegeben. Mit zunehmender C3-Konzentration erhöhte sich die Menge des inaktivierten C3, ohne daß noch eine vollständige

Hemmung von hämolytischem C3 erreicht wurde. Eine Sättigung der C3-Inaktivierung mit dem LPS-R war erst erreicht, nachdem C3-Konzentrationen über $3,6 \times 10^9$ eff.Mol./ml angeboten worden waren. Die Anzahl der inaktivierten C3-Moleküle belief sich dann auf ca. $6,5 \times 10^8$ eff.Mol./ml.

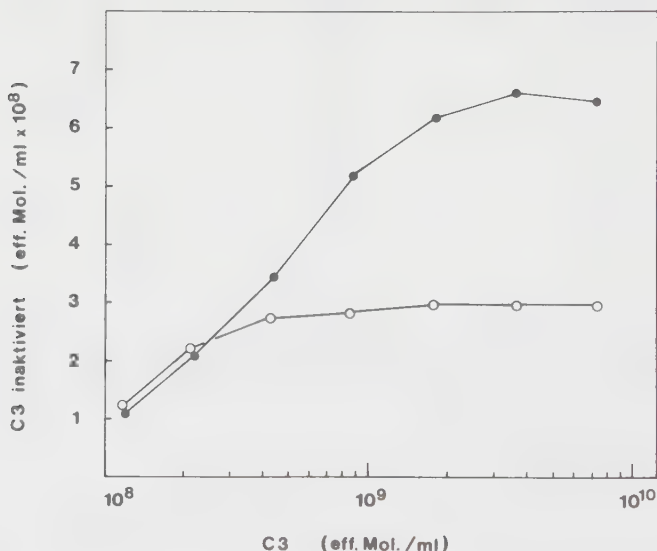


Abb. 37 Bestimmung der C3-Inaktivierungskapazität für das LPS-R und LPS-S von Ye 75

Inkubation von C3 in $\text{VBS}^{--} + 4,5 \text{ mM } \text{Ca}^{++}$ mit $160 \mu\text{g/ml}$ LPS-S (○—○) und LPS-R (●—●) für 12 h bei 4°C .

In weiteren Versuchen wurde ein starker Einfluß der TEA-Aufbereitung auf die Inaktivierungskapazität der Lipopolysaccharide deutlich (Tab. 10). Durch die Lösung von LPS mit steigenden TEA-Konzentrationen wurde die Inaktivierungskapazität des LPS-R gesenkt, während die des LPS-S erhöht wurde. Unter Berücksichtigung von Reaktionsablauf (Tab. 9) und Inaktivierungskapazität (Tab. 10) gewährleistete die

Aufbereitung mit 10 mM TEA für LPS-R und LPS-S gute Versuchsbedingungen.

Tab. 10 Einfluß der Triethylaminkonzentration auf die Inaktivierungskapazität des LPS-S und LPS-R von Ye 75

LPS-Vorbehandlung mit TEA (mM)	C3-inaktiviert (%) durch:	
	LPS-S	LPS-R
0	1	54
10	7	38
50	13	30
100	30	25
150	29	23

Testansatz und Inkubationsbedingungen wie in Legende zu Abb. 37; C3 eingesetzt: $1,8 \times 10^9$ eff.Mol./ml $\hat{=}$ 100%.

3.5. Hemmung der hämolytischen C3-Aktivität durch LPS von verschiedenen Bakterienarten und durch isolierte LPS-Strukturkomponenten

Mit den folgenden Experimenten wurde geprüft, inwieweit die bisherigen Ergebnisse über die Reaktion von C3 mit dem LPS-R und LPS-S von Ye 75 auch für extrahierte Lipopolysaccharide anderer Bakterienarten gelten. Um darüberhinaus mehr Information über die Abhängigkeit der Reaktion von der LPS-Struktur zu bekommen, wurden auch LPS-Präparationen von R-Mutanten mit einem ausgeprägten Defekt in der Polysaccharidkette untersucht. Durch den Einsatz von isolierten Strukturkomponenten von LPS wurde schließlich versucht, den Reaktionsort von C3 am LPS-Molekül zu lokalisieren.

3.5.1. Vergleich von verschiedenen LPS-Präparationen

In diesen Versuchen wurden LPS-Präparationen von Wildstämmen von Yersinia pseudotuberculosis (Y.ps.), Escherichia coli (E.coli), Salmonella typhimurium (S.typh.) und Serratia marcescens (S.mar.) eingesetzt. Es wurde das Reaktionsverhalten gegenüber C3 in Abhängigkeit von divalenten Kationen (Ca^{++}) und der Triethylaminbehandlung geprüft. Die Ergebnisse, die in Tabelle 11 zusammengefaßt sind, zeigen, daß alle TEA-behandelten LPS-Präparationen in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen in der Lage waren, die eingesetzte C3-Aktivität zu hemmen. Die Fähigkeit zu Interaktion mit C3 war somit nicht auf Lipopolysaccharide von Yersinia enterocolitica beschränkt. In den anderen Versuchsansätzen zeigten sich aber deutliche Unterschiede im Reaktionsmuster der verschiedenen LPS-Präparationen.

Tab. 11 C3-Inaktivierung durch LPS von verschiedenen Bakterienarten

Reaktionsansätze	C3-Aktivität (%) nach Inkubation mit LPS von			
	Y.ps.	E.coli	S.typh.	S.mar.
LPS (unbehandelt) frisch*				
in VBS ⁻⁻ + Ca^{++}	87	63	15	9
in VBS ⁻⁻	100	102	85	80
LPS (10 mM TEA) frisch*				
in VBS ⁻⁻ + Ca^{++}	0	0	7	12
in VBS ⁻⁻	7	14	60	65

Die Werte entsprechen der prozentualen hämolytischen Aktivität von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,79 \times 10^8 \text{ eff.Mol./ml}$) nach 12 h Inkubation bei 4°C mit $160 \mu\text{g}$ LPS/ml in Bezug auf eine Kontrolle ohne LPS.

* Am Versuchstag frisch zubereitete LPS-Lösungen.

Ähnlich wie das LPS-R von Ye 75 reagierten die Lipopolysaccharide von Salmonella typhimurium und Serratia marcescens nur in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen unabhängig von der TEA-Behandlung. Nur nach Triethylaminbehandlung, aber unabhängig von Ca^{++} , reagierten dagegen die LPS von Yersinia pseudotuberculosis und Escherichia coli und wiesen somit ein Reaktionsverhalten wie das LPS-S von Ye 75 auf.

3.5.2. Einfluß der Lipopolysaccharidstruktur

Diese Untersuchungen wurden mit LPS-Präparationen von verschiedenen Mutanten der Spezies Yersinia enterocolitica (Ye 75 S, Ye 75 R, Ye 161 S, Ye 161 R und Ye 161 Re) durchgeführt. Dem Reaktionsverhalten der Re-Form kam besondere Bedeutung zu, da diese lediglich aus dem Lipoid A, KDO und Glucosamin aufgebaut war (s. Tab. 19). Das Reaktionsverhalten dieser LPS-Präparate gegenüber C3 in Abhängigkeit von divalenten Kationen (Ca^{++}), der Triethylaminbehandlung und den Lagerungsbedingungen wurde geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Die Lipopolysaccharide mit vollständigen Seitenketten (LPS-S) reagierten erst nach einer Strukturveränderung durch TEA. Diese Strukturveränderung war reversibel, da die Reaktionsfähigkeit der LPS-Präparationen durch Einfrieren bei -70°C wieder verlorenging. Für die Lipopolysaccharide ohne Seitenketten (LPS-R) war für die Interaktion mit C3 lediglich noch eine Katalyse durch divalente Kationen erforderlich. Der weiter fortschreitende Defekt im Kernoligosaccharid bis zur Re-Form machte dann auch den Zusatz von Ca^{++} -Ionen überflüssig.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Interaktion zwischen C3 und LPS stark von der LPS-Struktur beeinflußt wurde. Der Reaktionsort von C3 am LPS-Molekül mußte entsprechend diesen Ergebnissen im Bereich des Lipoid A liegen. Veränderungen der Reaktionsbedingungen nahmen auf die Interaktion dieses Molekülbereiches mit C3 keinen Einfluß mehr.

Tab. 12 Hemmung der C3-Aktivität durch Lipopolysaccharide von Glatt- und Rauhformen von Yersinia enterocolitica 75 und 161

Reaktionsansätze mit C3		C3-Aktivität (%) nach Inkubation mit LPS von				
		Ye 75 S	Ye 161 S	Ye 75 R	Ye 161 R	Ye 161 Re
LPS (unbehandelt) frisch ^{XX}						
in VBS ⁻⁻⁻ + Ca ⁺⁺	100	104	21	11	33	
in VBS ⁻⁻⁻	100	99	101	101	24	
LPS (10 mM TEA) frisch ^{XX}						
in VBS ⁻⁻⁻ + Ca ⁺⁺	3	4	18	8	24	
in VBS ⁻⁻⁻	42	27	100	100	15	
LPS (10 mM TEA) gefroren ^{XX}						
in VBS ⁻⁻⁻ + Ca ⁺⁺	96	99	6	10	30	
in VBS ⁻⁻⁻	96	96	93	99	16	

Die Werte entsprechen der prozentualen hämolytischen Aktivität von C3 (4 µg/ml $\pm 1,69 \times 10^8$ eif.Mol./ml) nach 12 h Inkubation bei 40°C mit 160 µg LPS/ml in Bezug auf eine Kontrolle ohne LPS.

^{XX} Am Versuchstag frisch zubereitete LPS-Lösungen.
^{XX} Bei -70°C gelagerte LPS-Lösungen.

3.5.3. Wirkung von isolierten LPS-Strukturkomponenten

Verschiedenen LPS-Präparaten von Yersinia enterocolitica (Ye 75 S; Ye 75 R und Ye 161 Re) wurden stufenweise von bestimmten Substituenten befreit. Der Abbau erfolgte vom LPS über LPS-OH bis zum Lipoid A-OH (s. Methoden 1.3.). Die Ergebnisse der Versuche mit den bei den Abbaureaktionen gewonnenen Fraktionen sowie den ursprünglichen LPS-Präparationen wurden in Tabelle 13 zusammengestellt. Auch hier wurde das Reaktionsverhalten gegenüber C3 in Abhängigkeit von divalenten Kationen (Ca^{++}) sowie der Triethylaminbehandlung analysiert. Lediglich das Lipoid A-OH konnte auf Grund der absoluten Unlöslichkeit in H_2O nur nach Lösung in TEA eingesetzt werden.

Wie erwartet (vergl. Abschnitt 3.5.2.) reagierte LPS-S nur nach Triethylaminbehandlung. Die Reaktion von C3 mit LPS-R benötigte die Katalyse durch Ca^{++} -Ionen. Das LPS-Re reagierte unabhängig von den Reaktionsbedingungen mit C3. Nach Abspaltung von Zuckern und estergebundenen Fettsäuren durch milde alkalische Hydrolyse wiesen die LPS-OH-Fragmente ein deutlich geringeres Reaktionsvermögen auf. Das nach milder saurer Hydrolyse gewonnene Lipoid A-OH hatte gar keinen inaktivierenden Einfluß auf die C3-Aktivität mehr.

In diesen Experimenten konnte besonders deutlich mit dem LPS von Ye 161 Re, das in seinem nativen Zustand nur aus dem Lipoid A, KDO und Glucosamin besteht, gezeigt werden, daß durch den Verlust der estergebundenen Fettsäuren die Inaktivierungsfähigkeit für C3 verloren ging. Daraus folgt, daß der hydrophobe Teil des LPS-Moleküles für die Interaktion mit C3 verantwortlich war. Der Anteil der amidgebundenen Fettsäuren am Lipoid A-OH reichte offensichtlich nicht mehr aus, um die Inaktivierung von C3 zu ermöglichen.

Tab. 13 Inaktivierung von C3 durch LPS und LPS-Abbauprodukte von Yersinia enterocolitica 75 S, 75 R und 161 Re

LPS und LPS-Abbauprodukte	C3-Aktivität (%) nach Inkubation mit	
	LPS in VBS ⁻⁻⁻ + Ca ⁺⁺	VBS ⁻⁻⁻
<u>Ye 75 S</u>		
LPS unbehandelt	99 (5) [*]	89 (17) [*]
LPS-OH	102 (100)	97 (99)
Lipoid-A-OH	n.b. (100)	n.b. (96)
<u>Ye 75 R</u>		
LPS unbehandelt	15 (16)	83 (97)
LPS-OH	63 (76)	98 (102)
Lipoid-A-OH	n.b. (103)	n.b. (107)
<u>Ye 161 Re</u>		
LPS unbehandelt	27 (29)	18 (24)
LPS-OH	65 (81)	54 (79)
Lipoid-A-OH	n.b. (98)	n.b. (103)

Die Ergebnisse entsprechen der prozentualen hämolytischen Aktivität von C3 ($4 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,32 \times 10^8 \text{ eff.Mol./ml}$) nach 12 h Inkubation bei 4°C mit $160 \mu\text{g/ml}$ der jeweiligen LPS-Präparationen.

^{*} Die Werte in Klammern stellen die Ergebnisse nach Behandlung der Präparate mit Triethylamin (10 mM) dar.
n.b. = nicht bestimmt

4. Hemmung der hämolytischen C5-Aktivität durch LPS-S und LPS-R von Yersinia enterocolitica (Ye 75)

Steigende Konzentrationen des mit TEA (10 mM) behandelten LPS-R oder LPS-S wurden mit hämolytisch aktivem C5 in VBS⁻⁻⁻-Puffer ohne oder mit Ca⁺⁺-Zusatz inkubiert. Die Ergebnisse, die in Abb. 38 dargestellt wurden, machen deutlich, daß auch die C5-Aktivität durch beide LPS-Präparationen

gehemmt werden konnte. Im Gegensatz zur C3-Inaktivierung wies die Reaktion des C5 mit dem LPS-R und LPS-S von Ye 75 kein Kationenbedürfnis auf. Stattdessen übten divalente Kationen sogar einen hemmenden Effekt aus, der beim LPS-R besonders ausgeprägt war.

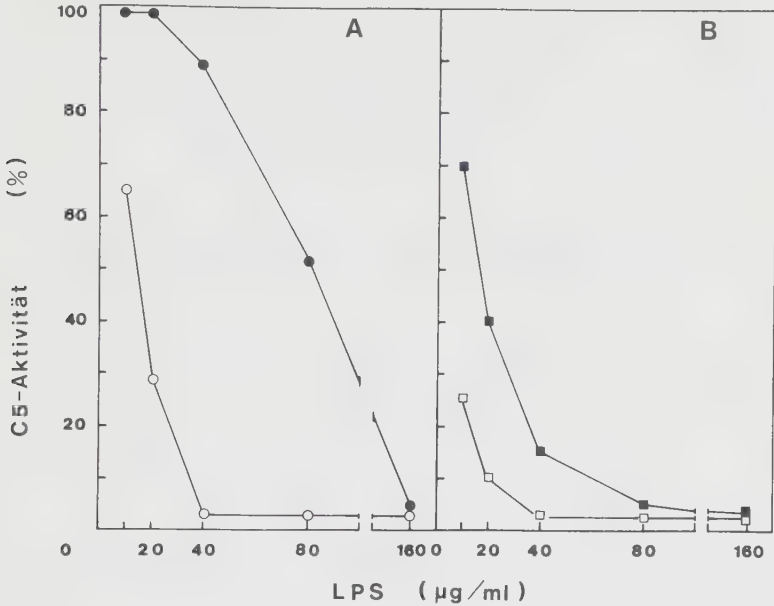


Abb. 38 Hemmung der C5-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des LPS-R und LPS-S von Ye 75

- A. LPS-R (Ye 75) + 4,5 mM Ca⁺⁺ ● — ●
 LPS-R (Ye 75) ○ — ○
- B. LPS-S (Ye 75) + 4,5 mM Ca⁺⁺ ■ — ■
 LPS-S (Ye 75) □ — □

C5 (1 ng/ml $\hat{=}$ 1,42 eff.Mol./ml) wurde in VBS⁻⁻⁻ mit und ohne Ca⁺⁺-Zusatz (4,5 mM) für 3 h bei 40°C mit LPS-S und LPS-R von Ye 75 inkubiert. Die hämolytische Aktivität wurde im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne LPS ermittelt und in % aufgetragen.

Es stellte sich auch die Frage, ob für die Interaktion zwischen LPS und C5 eine chemische Modifikation des LPS mit TEA (10 mM) notwendig war. Aus Tabelle 14 ist zu entnehmen, daß die Inaktivierung der C5-Aktivität durch LPS-R und LPS-S auch ohne Triethylaminbehandlung des LPS stattfand. Darüberhinaus blieb die Reaktionsfähigkeit des LPS auch nach Gefrieren bei -70°C erhalten. Der Hemmeffekt von Ca^{++} -Ionen war auch in diesen Experimenten deutlich. Für die folgenden Experimente über die Reaktion von LPS-R mit C5 wurden LPS-Präparationen ohne Triethylaminbehandlung verwendet. Die Inkubation erfolgte in VBS^{--} -Puffer ohne Zusätze.

Tab. 14 Inaktivierung von C5 durch LPS-R und LPS-S von Ye 75 in Abhängigkeit von den Präparationsbedingungen für das LPS

Ansätze für die Reaktion von LPS mit C5	C5-Aktivität (%) nach Inkubation mit LPS von	
	<u>Ye 75 S</u>	<u>Ye 75 R</u>
LPS		
in $\text{VBS}^{--} + \text{Ca}^{++}$	101	82
in VBS^{--}	40	5
LPS (10 mM TEA) frisch ^x		
in $\text{VBS}^{--} + \text{Ca}^{++}$	25	88
in VBS^{--}	5	3
LPS (10 mM TEA) gefroren ^{xx}		
in $\text{VBS}^{--} + \text{Ca}^{++}$	88	76
in VBS^{--}	21	3

Versuchsansatz und Inkubationsbedingungen wie in Legende zu Abb. 38. LPS-Konzentration: 40 µg/ml

^x LPS in Triethylamin am Versuchstag solubilisiert.

^{xx} Lagerung des solubilisierten LPS bei -70°C vor Einsatz im Versuch.

4.1. Wirkung von LPS-R nach Absättigung mit C5 auf die hämolytische Aktivität von C3

Im folgenden Experiment wurde geprüft, ob LPS-R nach Vorbehandlung mit C5 weiterhin eine Reaktion mit C3 eingehen konnte. Zunächst wurde die maximale Inaktivierungskapazität von LPS-R für C5 ermittelt. Diese nicht dargestellten Vorversuche ergaben, daß 160 µg/ml LPS-R während einer Inkubation von 3 Stunden bei 4°C in VBS⁻⁻⁻-Puffer 3×10^{11} eff.Mol. C5/ml ($\hat{=}$ 2 µg/ml) vollständig hemmen konnten. Die Reaktionsansätze mit C5-gesättigtem LPS-R wurden dann mit Ca⁺⁺-Ionen (4,5 mM) versetzt und mit steigenden Konzentrationen an C3 (1×10^8 bis 7×10^9 eff.Mol./ml) inkubiert. Das C5-gesättigte LPS-R war auch weiterhin in der Lage C3 zu inaktivieren (Abb. 39). Im Vergleich zur Kontrolle (LPS-R ohne C5) ergab sich lediglich eine Verminderung der Inaktivierungskapazität von $6,4 \times 10^8$ eff.Mol./ml auf $4,0 \times 10^8$ eff.Mol./ml.

Mit dem LPS-S von Ye 75 wurden ähnliche Experimente durchgeführt (nicht dargestellt). Nach C5-Sättigung des LPS-S war keine weitere C3-Inaktivierung mehr zu beobachten.

In den bisher beschriebenen Experimenten ließ sich zeigen, daß Lipopolysaccharide außer C3 auch C5 inaktivieren können. Die Reaktionsbedingungen für den Nachweis einer Hemmwirkung waren aber für beide Komplementproteine sehr verschieden. Mit dem LPS-R von Ye 75 gelang darüberhinaus der Nachweis, daß beide Proteine durch dasselbe LPS-R nacheinander inaktiviert werden konnten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß verschiedene Reaktionsorte am LPS-R-Molekül für die Inaktivierung verantwortlich waren.

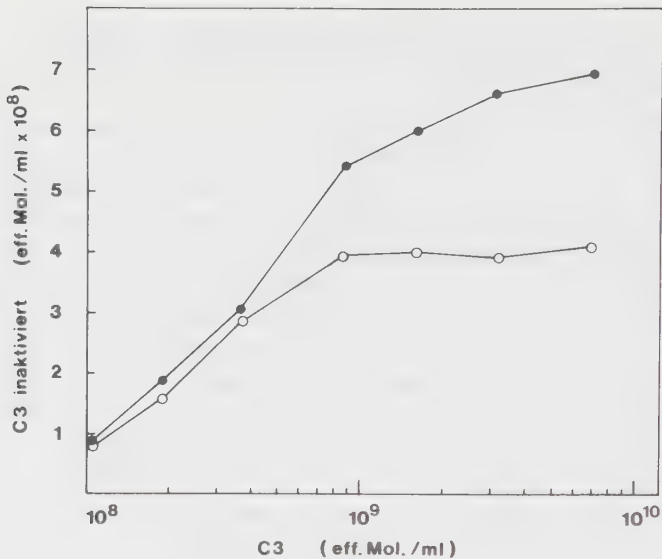


Abb. 39 Inaktivierung von C3 durch LPS-R nach Sättigung mit C5

LPS-R-C5 + C3 ○—○ LPS-R + C3 (Kontrolle) ●—●

Reaktionsansätze mit C3 (1×10^8 eff. Mol./ml bis 7×10^9 eff. Mol./ml) wurden in VBS⁻⁻⁻ + 4,5 mM Ca⁺⁺ mit LPS-R (160 µg/ml) und mit C5-gesättigtem LPS-R (160 µg/ml) + 3×10^{11} eff. Mol. C5/ml) 12 h bei 4°C inkubiert. Die Anzahl der inaktivierten Moleküle wurde im Vergleich zu einer Kontrolle ohne LPS ermittelt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll nun am Beispiel des C3 genauer analysiert werden, welcher Reaktionsmechanismus der Hemmwirkung von LPS auf Komplementproteine zugrunde liegt.

5. Komplexbildung zwischen C3 und LPS-R und LPS-S von Ye 75

5.1. Dichtegradientenzentrifugation der LPS-C3-Komplexe

Der experimentelle Nachweis einer Komplexbildung zwischen C3 und dem LPS-R und LPS-S von Ye 75 wurde zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation versucht. Reaktionsgemische aus ^{14}C -C3 und LPS-S sowie aus ^{14}C -C3 und LPS-R, in denen nach 12 h Inkubation bei 4°C keine hämolytische Aktivität mehr nachweisbar war, und ein Kontrollansatz aus ^{14}C -C3 ohne LPS wurden auf separate, diskontinuierlich geformte Sucrosegradienten gegeben. Nach der Zentrifugation wurden die Gradientenröhrchen ausgetropft und die Radioaktivität bestimmt. Die Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Gradienten wurde graphisch in Abb. 40 dargestellt.

Das mit LPS inkubierte ^{14}C -C3 wies immer eine größere Sedimentationsgeschwindigkeit als das Kontroll-C3 auf, wobei eindeutig zu sehen war, daß die Art des verwendeten LPS (Rauhform oder Glattform) das Sedimentationsverhalten von ^{14}C -C3 bestimmte. Es war daher anzunehmen, daß sich das C3-Protein während der Inkubation an LPS angelagert hatte. Die mit dem LPS-S gebildeten Komplexe zeigten dabei nur eine relativ geringe Veränderung in der Sedimentationsgeschwindigkeit gegenüber dem Kontroll-C3 und konnten als homogener Peak im Sucrosegradienten erfaßt werden. Die Reaktionsprodukte von ^{14}C -C3 mit LPS-R waren dagegen nach der Zentrifugation über einen großen Bereich des Gradienten verteilt. Diese diffuse Verteilung der Radioaktivität mit einer Konzentrierung im Bereich von ca. 80% Sucrose ließ eine Bindung von ^{14}C -C3 an stark aggregiertes LPS-R vermuten.

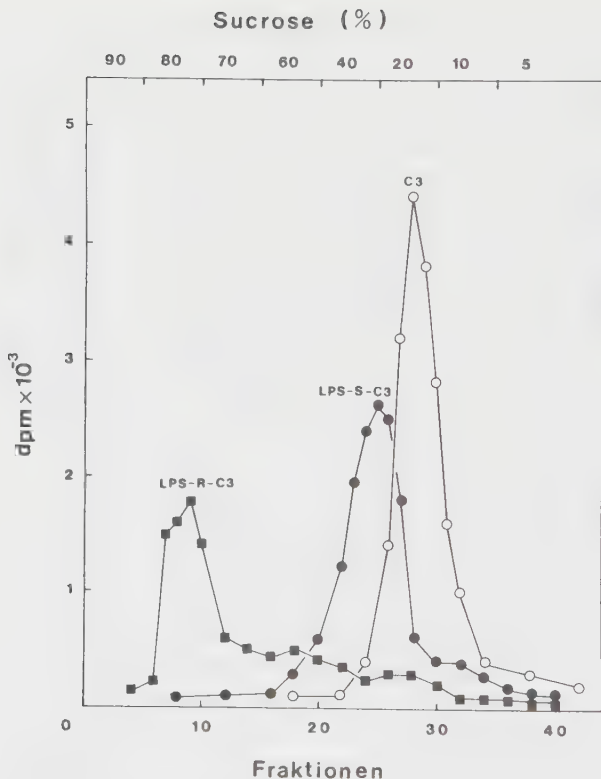


Abb. 40 Sedimentation der Reaktionsprodukte aus LPS-S bzw. LPS-R von Ye 75 und ^{14}C -C3 und von Kontroll-C3

^{14}C -C3 + LPS-S ● — ●
 ^{14}C -C3 + LPS-R ■ — ■
 ^{14}C -C3 ○ — ○

12 ml eines diskontinuierlichen Sucrosegradienten (90/80/70/60/40/20/10/5 % w/v) in 10 mM KPO_4 -Puffer/150 mM NaCl; pH 7,3 wurden mit 0,5 ml der Reaktionsansätze überschichtet und 17 h bei 35000 UpM zentrifugiert.

Reaktionsansätze: 10 μg ^{14}C -C3 (≈ 29000 dpm) wurden allein (Kontrolle) oder mit 400 μg LPS/ml in VBS[—]-Puffer + 4,5 mM Ca^{++} für 12 h bei 4°C inkubiert.

Durch intensive Ultraschallbehandlung des LPS-R vor Verwendung im Test wurde versucht, die Löslichkeit des LPS-R zu erhöhen und die Ausbildung von kleineren, homogenen LPS-R-C3-Komplexen zu induzieren.

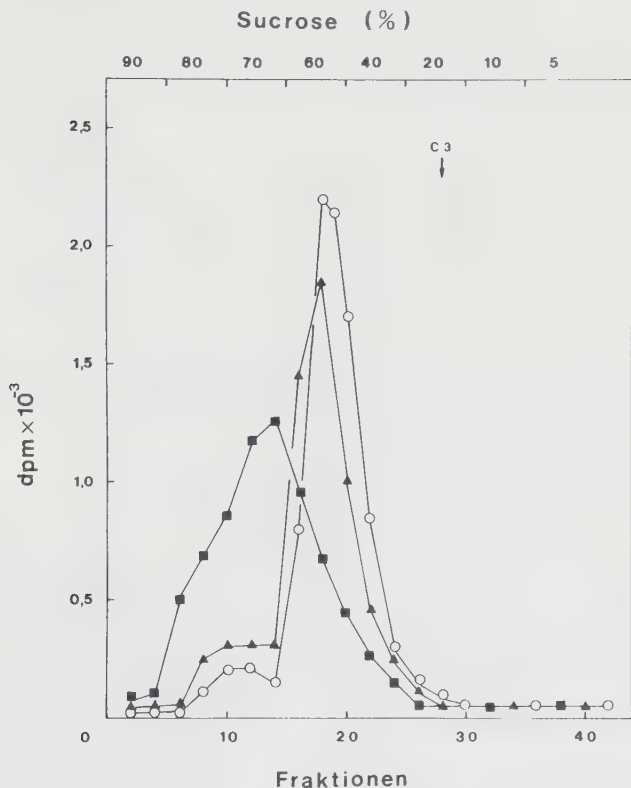


Abb. 41 Sedimentation der Komplexe aus ultraschall-behandeltem LPS-R und ^{14}C -C3

LPS-R- ^{14}C -C3 (LPS-R 10 min beschallt)	■ — ■
LPS-R- ^{14}C -C3 (LPS-R 20 min beschallt)	▲ — ▲
LPS-R- ^{14}C -C3 (LPS-R 30 min beschallt)	○ — ○

Versuchs- und Inkubationsbedingungen wie in Legende zu Abb. 40.

In Abhängigkeit von der Dauer der Ultraschallbehandlung (10-30 min) ergaben sich nach Inkubation mit ^{14}C -C3 und anschließender Ultrazentrifugation deutliche Unterschiede im Sedimentationsverhalten des an LPS-R angelagerten ^{14}C -C3 (Abb. 41). Die während der Inkubation gebildeten LPS-R-C3-Komplexe wurden mit zunehmender Dauer der Ultraschallbehandlung kleiner. Eine Ultraschallbehandlung von 30 min ergab schließlich ein homogenes Reaktionsprodukt aus LPS-R und C3 mit einem Sedimentationsgleichgewicht von ca. 60% Sucrose.

Die kleineren Komplexe, welche aus ultraschallbehandeltem LPS-R oder LPS-S und C3 gebildet worden waren, konnten im kontinuierlichen Sucrosegradienten dargestellt werden (Abb. 42). Obwohl die Berechnung der Sedimentationskonstante streng genommen nur für Protein mit gleichem partiellen spezifischen Volumen Gültigkeit hat, wurden hier zur Abschätzung der Größe der gebildeten LPS-C3-Komplexe die Sedimentationskonstanten sowie die Molekulargewichte mit Hilfe von Katalase als Referenzprotein bestimmt (Tab. 15).

Tab. 15 Bestimmung von Sedimentationskonstante und Molekulargewicht von Komplexen aus ultraschallbehandeltem LPS und C3

Reaktionsprodukt	$S_{20,w}$	$\text{MG} \times 10^{-3}$
LPS-S-C3	14,6	362
LPS-R-C3	23,3	731
C3	8,66	166

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten und Molekulargewichte erfolgte entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.1. .

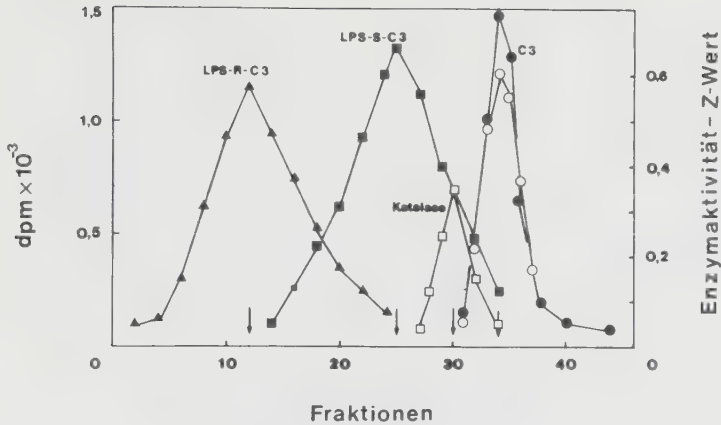


Abb. 42 Sedimentation von ^{14}C -C3 (Kontrolle) und von Komplexen aus ultraschallbehandeltem LPS-R und LPS-S von Ye 75 und ^{14}C -C3 im kontinuierlichen Sucrosegradienten

^{14}C -C3 + LPS-S ■ — ■
 ^{14}C -C3 + LPS-R ▲ — ▲
 ^{14}C -C3 ● — ●
 hämolytische Aktivität von ^{14}C -C3 ○ — ○
 Katalaseaktivität □ — □

12 ml eines linearen Sucrosegradienten (10-70% Sucrose; w/v) wurden mit 0,5 ml der verschiedenen Reaktionsansätze einschließlich 0,5 mg Katalase überschichtet und 17 h bei 35000 UpM zentrifugiert. Die Pfeile (↓) markieren die Fraktionen mit maximaler Enzym- bzw. Radioaktivität.

Reaktionsansätze: 10 μg ^{14}C -C3 (≈ 29440 dpm) wurden allein (Kontrolle) oder mit 200 μg LPS/ml in VBS⁺⁺-Puffer + 4,5 mM Ca^{++} bei 4°C für 12 h inkubiert. LPS-R und LPS-S waren vor der Inkubation 30 min mit Ultraschall behandelt worden. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 mg/ml Katalase zugefügt.

5.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von LPS-C3-Komplexen

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde als weitere Methode zum Nachweis der Komplexbildung zwischen C3 und LPS eingesetzt, da in diesen Gelen Makromoleküle sowohl nach Größe wie auch nach Bruttoladung aufgetrennt werden. Auf Grund der in Abschnitt 5.1. bestimmten Größenordnung der Komplexe, wurde für die Elektrophorese das von PEACOCK und DINGMANN (83) beschriebene Agarose-Mischgel (3% Acrylamid + 0,5% Agarose) verwendet. Die Autoren wiesen in diesem Gel einen Trennbereich für RNA-Moleküle in der Größenordnung von 10^4 - 10^8 Dalton nach. Um eine weitere Konzentrierung der Probe zu erreichen, wurde in den hier durchgeführten Experimenten zusätzlich ein Sammelgel (3% Acrylamid) über das Mischgel polymerisiert.

Zunächst wurden Reaktionsgemische aus C3 (10 µg/ml) und LPS-R oder LPS-S (200 µg/ml) angesetzt, in denen nach der Inkubation von 12 h bei 4°C keine hämolytische C3-Aktivität mehr nachweisbar war. Danach erfolgte eine Konzentrierung der Reaktionsansätze in Kollodiumhülsen bis zu einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml. Auf die Gele wurden dann die jeweils angegebenen Proteinmengen aufgetragen. Diese entsprachen der Menge des eingesetzten C3, da in Kontrollexperimenten weder durch Proteinbestimmung noch durch elektrophoretische Auftrennung Fremdprotein in den LPS-Präparationen nachgewiesen worden war. Die angefärbten Proteinbanden, welche in diesen gelelektrophoretischen Untersuchungen gefunden wurden, entsprachen somit dem in der Probe enthaltenen C3.

Die in Abb. 43 dargestellte Auftrennung der Reaktionsprodukte aus C3 und LPS-S oder LPS-R zeigte, daß die relative Mobilität des nativen C3 durch die Inkubation mit LPS verändert worden war. Je nach Art des für die Inkubation verwendeten LPS (Rauh- oder Glatzform) traten Banden an verschiedenen Stellen des Gels auf, deren Wanderungsstrecke aber stets

kleiner war als die von nativem C3. Im einzelnen konnten für die Reaktionsprodukte aus C3 und LPS-S zwei distinkte Proteinbanden nachgewiesen werden, von denen aber nur eine davon vollständig in dem Gel lokalisiert war. Nach Reaktion mit dem LPS-R färbte sich C3 dagegen überwiegend an der Oberkante des Gels und als diffuse Zone innerhalb des Gels an. Obwohl für die Reaktion mit C3 ultraschallbehandeltes LPS-S bzw. LPS-R verwendet wurde (vergl. Abschnitt 5.1.), machte dies Ergebnis deutlich, daß die Reaktionsprodukte von C3 und LPS immer noch in Größe und Ladung heterogen waren.

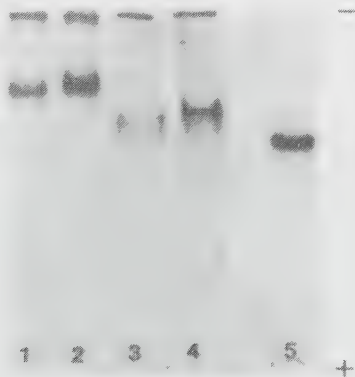


Abb. 45 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Komplexen aus C3 und LPS-S oder LPS-R von Ye 75

Bahn:

1. LPS-S-C3 (5 µg C3)
2. LPS-S-C3 (10 µg C3)
3. LPS-R-C3 (5 µg C3)
4. LPS-R-C3 (10 µg C3)
5. C3 (10 µg C3)

Gelzusammensetzung: 3% Acrylamid + 0,5% Agarose

Durchführung der Elektrophorese siehe Methoden (10.2.).

Zur Untersuchung der Größe von LPS-C3-Komplexen wurde auch die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. In Abb. 44 wurde die elektrophoretische Auftrennung der gebildeten LPS-C3-Komplexe in Gegenwart von SDS dargestellt. Die im nichtreduzierten oder reduzierten Zustand aufgetragenen Reaktionsprodukte von LPS-S und C3 konnten als Proteinbande im Gel angefärbt werden, wobei die relative Mobilität gegenüber dem Kontroll-C3 verändert war. Die unspezifische Proteinfärbung von C3 nach der Reaktion mit dem LPS-R ließ dagegen sowohl mit als auch ohne Reduktion, Proteinbanden erkennen, deren relative Mobilität mit denen der Kontrolle identisch war. Offensichtlich war unter diesen denaturierenden Bedingungen die Bindung von C3 an das LPS-R reversibel (s. Abschnitt 6.4.). Vergleichende Untersuchungen über die Größe der LPS-S-C3- und LPS-R-C3-Komplexe in der SDS-PAGE erwiesen sich daher als unmöglich.

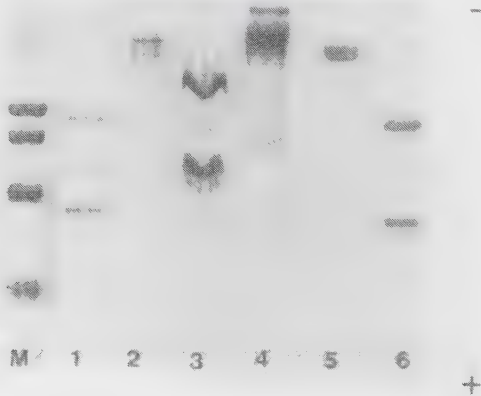


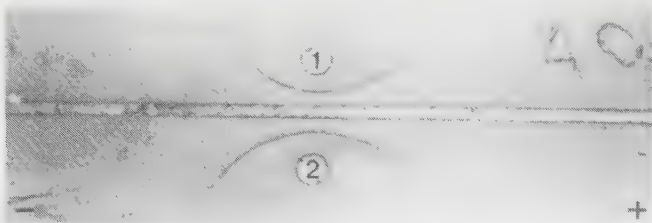
Abb. 44 SDS-PAGE von Komplexen aus C3 und LPS-S oder LPS-R von Ye 75 in einem 7,5%igen Gel

- Bahn: 1. LPS-R-C3 10 µg C3, reduziert
2. LPS-R-C3 10 µg C3
3. LPS-S-C3 10 µg C3, reduziert
4. LPS-S-C3 10 µg C3
5. C3 5 µg C3
6. C3 5 µg C3, reduziert
M. Referenzproteine je 10 µg, reduziert (s.Leg. zu Abb.9)

5.3. Immunelektrophorese von LPS-C3-Komplexen

In diesen Experimenten wurde untersucht, ob sich C3 nach Reaktion mit dem LPS-S und LPS-R von Ye 75 in der Immunelektrophorese darstellen läßt und ob die Wanderungsgeschwindigkeit von C3 durch die Bindung an LPS verändert wird. Die LPS-C3-Komplexe wurden durch Inkubation von ultraschallbehandeltem LPS-R (200 µg) bzw. LPS-S (200 µg) mit C3 (10 µg) in VBS⁺⁺ + 4,5 mM Ca⁺⁺ hergestellt. Für die mit beiden LPS gebildeten LPS-C3-Komplexe konnten im Anschluß an die Elektrophorese und nach Zugabe des Anti-C3 Antiserums Präzipitationslinien nachgewiesen werden (Abb. 45).

Abb. 45 a

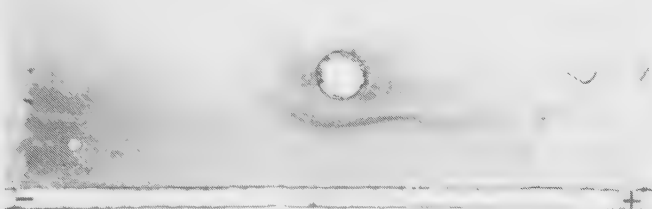


Loch 1: C3, 10 µl ($\hat{=}$ 2 µg Protein)

Loch 2: C3, 10 µl ($\hat{=}$ 3 µg Protein)

Rinne : Anti-C3 Antiserum

Abb. 45 b



Loch : LPS-R-C3, 20 µl ($\hat{=}$ 2 µg Protein)

Rinne : Anti-C3 Antiserum

Abb. 45 c



Loch : LPS-S-C3, 20 μ l ($\hat{=}$ 2 μ g Protein)

Rinne : Anti-C3 Antiserum

Abb. 45 Immunelektrophorese von C3 und LPS-C3-Komplexen

Die Präzipitationslinien lassen aber erkennen, daß C3 im Komplex mit LPS-S verstärkt in Richtung Kathode wanderte, während sich die LPS-R-C3-Komplexe mehr im anodischen Bereich konzentrierten. Die elektrophoretische Beweglichkeit von C3 wurde durch die Inkubation mit LPS somit deutlich verändert.

5.4. Korrelation zwischen Inaktivierung von C3 und
Ausbildung von LPS-C3-Komplexen

Die Beziehung zwischen dem Verlust der hämolytischen C3-Aktivität und der Ausbildung von LPS-C3-Komplexen sollte in den folgenden Experimenten geprüft werden. Hierzu wurde ^{14}C -C3 (5 $\mu\text{g/ml}$) mit LPS-R oder LPS-S von Ye 75 (200 $\mu\text{g/ml}$) unter Bedingungen inkubiert, welche einen vollständigen Verlust der C3-Aktivität gewährleisteten (Aufbereitung des LPS mit 10 mM TEA; Inkubation in Gegenwart von 4,5 mM Ca^{++} -Ionen). In parallel angesetzten Reaktionsgemischen erfolgte die Inkubation dieser LPS-Präparationen mit ^{14}C -C3 unter veränderten Bedingungen, welche zu keiner C3-Inaktivierung führten (Aufbereitung des LPS ohne TEA; Inkubation in Abwesenheit von Ca^{++} -Ionen). Alle Reaktionsansätze wurden dann auf diskontinuierliche Sucrose-Gradienten aufgetragen und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Gradientenröhrchen fraktioniert und die Verteilung von Radioaktivität bzw.

hämolytischer Aktivität wurde gemessen. In Abb. 17 A und B ist die graphische Auswertung für die verschiedenen Reaktionsgemische dargestellt.

Das Sedimentationsverhalten von ^{14}C -C3 aus den Reaktionsansätzen a und c, in denen vollständige C3-Inaktivierung vorgelegen hatte, zeigte wiederum im Vergleich zur Kontrolle (^{14}C -C3) eine deutliche Zunahme in der Sedimentationsgeschwindigkeit (s. Abschnitt 5.1.). Im Gegensatz dazu sedimentierte ^{14}C -C3 aus den Reaktionsansätzen b und d, in denen die hämolytische Aktivität nach Inkubation mit LPS noch vorhanden war, an gleicher Stelle wie das Kontroll ^{14}C -C3. Die hämolytische Aktivität war ebenfalls in den Fraktionen nachweisbar.

Zusammenfassend läßt sich aus diesen Experimenten feststellen, daß der Verlust der hämolytischen Aktivität nur dann eintrat, wenn das Protein während der Inkubation an LPS angelagert wurde.

Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren Experiment bestätigt. Vorangegangene Versuche (s. Abschnitt 3.3.2.) zeigten, daß LPS-S seine durch Triethylaminbehandlung hervorgerufene Fähigkeit zur Inaktivierung von C3 nach Lagerung bei -70°C weitgehend verlor, wohingegen das Reaktionsvermögen des LPS-R hierdurch nicht beeinflußt wurde. Reaktionsansätze mit ^{14}C -C3 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und frischem bzw. bei -70°C gelagerten LPS-R oder LPS-S von Ye 75 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden inkubiert und anschließend im Sucrose-Gradienten zentrifugiert. Die Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Gradientenröhrchen zeigt Abb. 47 A und B.

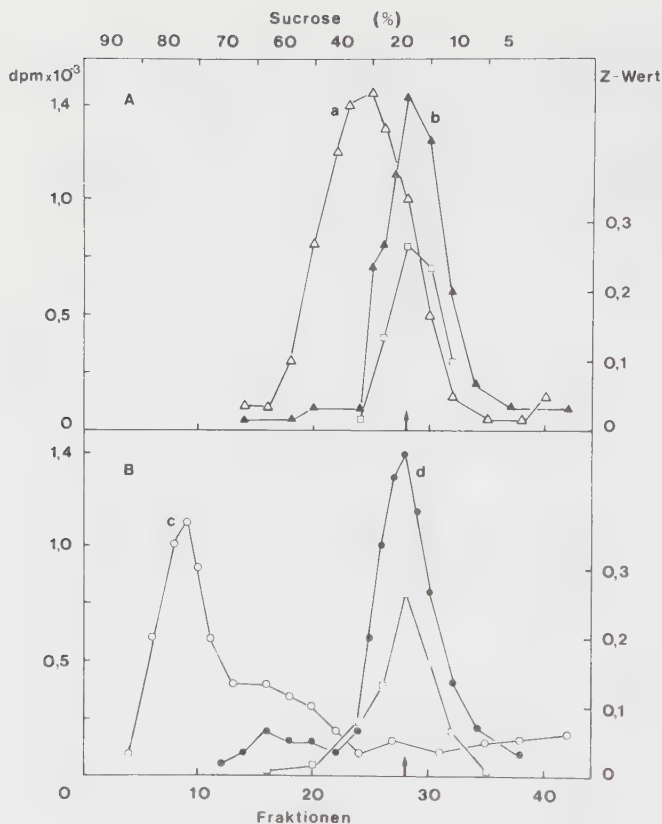


Abb. 46 Sedimentation von ^{14}C -C3 in diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten nach Inkubation mit LPS von Ye 75

Abb. 46 A: LPS-S + C3

Abb. 46 B: LPS-R + C3

Reaktionsansätze aus 5 μg ^{14}C -C3 (≈ 14780 dpm) und 200 μg LPS:

a. LPS-S (TEA) + C3 $\triangle$ — $\triangle$

c. LPS-R + Ca^{++} + C3 $\circ$ — $\circ$

b. LPS-S + C3 $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$

d. LPS-R + C3 $\bullet$ — $\bullet$

Hämolytische Aktivität: $\square$ — $\square$

Der Pfeil ($\uparrow$) markiert das Sedimentationsgleichgewicht von freiem, hämolytisch aktivem ^{14}C -C3.

Durchführung der Gradientenzentrifugation siehe Methoden (15.1.) und Legende zu Abb. 40.

Eine Zunahme in der Sedimentationsgeschwindigkeit von ^{14}C -C3 gegenüber der Kontrolle (^{14}C -C3 ohne LPS) wurde nur in den Reaktionsansätzen a, b und c bei gleichzeitiger Inaktivierung von hämolytischem C3 beobachtet. Der überwiegende Teil des ^{14}C -C3 aus dem Reaktionsansatz d, in dem das bei -70°C gelagerte nichtreaktive LPS-S eingesetzt worden war, zeigte dagegen die gleiche Sedimentationsgeschwindigkeit wie die Kontrolle.

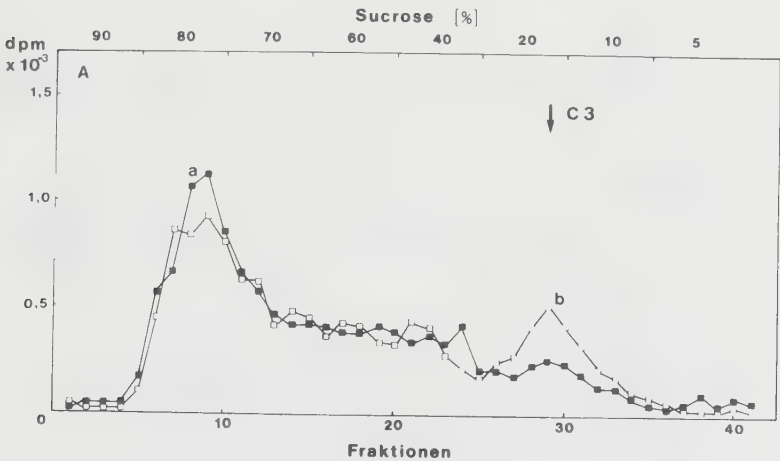


Abb. 47 A

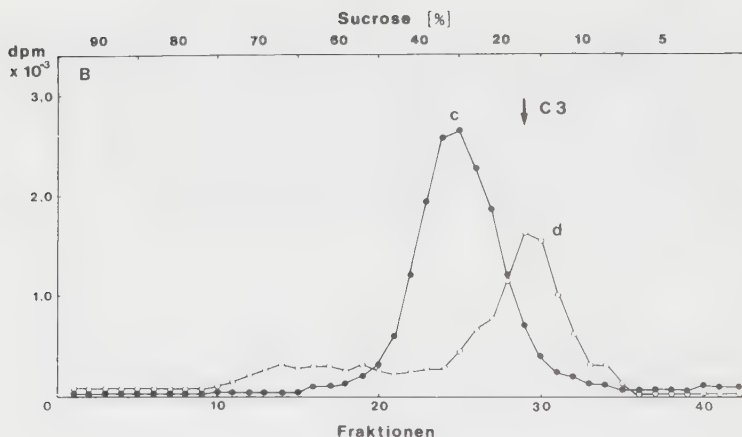


Abb. 47 B

Abb. 47 Sedimentation von ^{14}C -C3 nach Inkubation mit LPS von Ye 75 im diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten

Abb. 47 A: LPS-R + C3

Abb. 47 B: LPS-S + C3

Reaktionsansätze aus 5 μg C3 und 200 μg LPS:

- | | | |
|--|------|-------|
| a. LPS-R (frisch) | + C3 | ■ — ■ |
| b. LPS-R (gelagert bei -70°C) | + C3 | □ — □ |
| c. LPS-S (frisch) | + C3 | ● — ● |
| d. LPS-S (gelagert bei -70°C) | + C3 | ○ — ○ |

Durchführung der Experimente und Zentrifugation siehe
Legende zu Abb. 46.

6. Charakterisierung der Bindungsreaktion von C3 an LPS-R von Ye 75

Von den verschiedenen Lipopolysacchariden, welche das C3 ohne weitere chemische Modifikation inaktivieren konnten, wurde das LPS-R von Ye 75 für diese Versuche ausgewählt. Es stellte sich die Frage, über welchen Reaktionsmechanismus C3 an dieses LPS gebunden wurde.

6.1. Kinetik der C3-Bindung an LPS-R

In einem kinetischen Experiment wurde die Beziehung zwischen dem Verlust der hämolytischen C3-Aktivität und der Abnahme des freien C3-Proteins in Gegenwart von LPS-R untersucht. Dabei zeigte sich eine kontinuierliche und parallel verlaufende Abnahme von C3-Aktivität und C3-Protein (Abb. 48). Die Inaktivierung von C3 im Reaktionsansatz war somit zu jedem Zeitpunkt auf die Bildung von LPS-C3-Komplexen zurückzuführen.

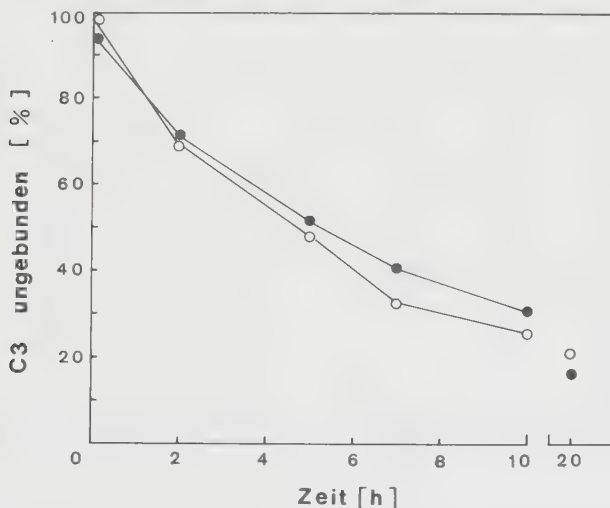


Abb. 48 Reaktionskinetik zur Inaktivierung und Bindung von C3 an LPS-R

ungebundene Radioaktivität ○ — ○
freie hämolytische Aktivität ● — ●

Reaktionsansätze mit ^{14}C -C3 (10 $\mu\text{g/ml} \hat{=} 29000 \text{ dpm/ml}$) wurden mit LPS-R (200 $\mu\text{g/ml}$) in VBS⁺⁺-Puffer + 4,5 mM Ca^{++} bei 4°C über verschiedene Zeiten inkubiert (17 h, 35000 UpM, 4°C). Nach Zentrifugation der Ansätze in diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten und anschließender Fraktionierung wurde die prozentual nicht gebundene Radioaktivität bzw. hämolytische Aktivität im Vergleich zu einer Kontrolle bestimmt.

Wiedergefundene Radioaktivität in der Kontrolle:
27920 dpm/ml $\hat{=} 100\%$.

6.2. Vergleich von C3- und C3b-Bindung an LPS-R

Mit zunehmender C3-Konzentration wurden steigende Mengen von Protein an eine konstante Menge LPS-R (200 µg/ml) gebunden (Abb. 49). Bei einer angebotenen ^{14}C -C3-Konzentration von 80 µg Protein/ml ($3,7 \times 10^9 \text{ eff. Mol. / ml} \hat{=} 23 \times 10^5 \text{ dpm / ml}$) war ein Sättigungswert erreicht, bei dem ca. 25 µg C3 an 200 µg LPS-R gebunden worden waren.

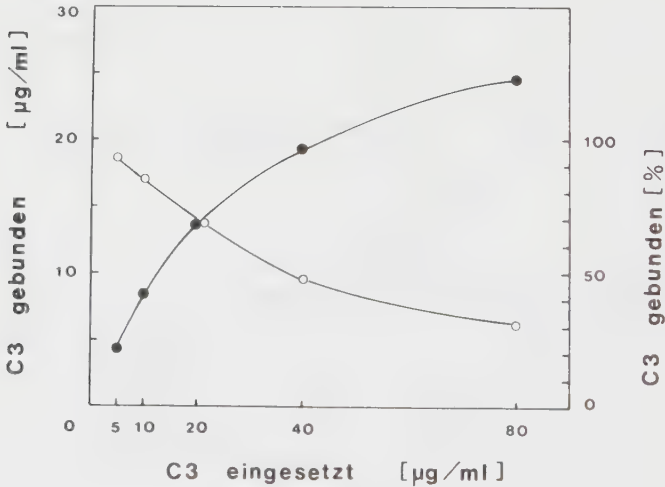


Abb. 49 Bindung von C3 an LPS-R in Abhängigkeit von der eingesetzten C3-Menge

gebundenes ^{14}C -C3 (µg/ml) ● — ●
gebundenes ^{14}C -C3 (%) ○ — ○

Versuchs- und Inkubationsbedingungen wie in Legende zu Abb.48. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die freie Radioaktivität im Vergleich zu einer Kontrolle ohne LPS bestimmt. Aus der Differenz wurde der gebundene Anteil kalkuliert.

Dieser Wert war aber in Wiederholungsexperimenten nicht konstant. Die gebundene Menge an C3 variierte in Abhängigkeit vom Aggregationszustand des LPS-R (Tab. 16). Die in dieser Tabelle dargestellten Ergebnisse zeigten, daß mit steigenden TEA-Mengen das C3-Bindungsvermögen von LPS-R abnahm. Daher wurde in den folgenden Versuchen auf die bisher übliche Behandlung von LPS-R mit 10 mM TEA verzichtet.

Tab. 16 Bindungskapazität von LPS-R für ^{14}C -C3 in Abhängigkeit von der Triethylaminaufbereitung

^{14}C -C3 eingesetzt ($\mu\text{g/ml}$)	^{14}C -C3 gebunden ($\mu\text{g/ml}$) Triethylaminkonzentration (mM)			
	0	10	50	100
5	4,7	4,5	4,3	4,3
10	8,5	7,5	7,3	7,5
20	14,6	12,2	11,2	9
40	21,6	15,2	12,0	10
80	31	23	16,8	10,5
100	32	23,2	17,0	10

Versuchsbedingungen und Bestimmung der gebundenen Menge an ^{14}C -C3 wie in Legende zu Abb. 49.

Zum Studium der C3b-Bindung an LPS-R wurde lösliches ^{14}C -C3b eingesetzt, welches durch Trypsinspaltung aus nativem ^{14}C -C3 gewonnen worden war. Bei dieser Trypsinspaltung wird natives C3 nicht nur in das große C3b-Fragment und das kleine C3a-Fragment gespalten, sondern es kommt auch zur Hydrolyse des internen Thioester von C3 (R-S-OH), der die Bindung von C3b an Oberflächen vermittelt (24). Versuche mit dem C3b-Fragment zeigten, daß seine Bindung an LPS-R viel geringer war als die von nativem C3 (Abb. 50).

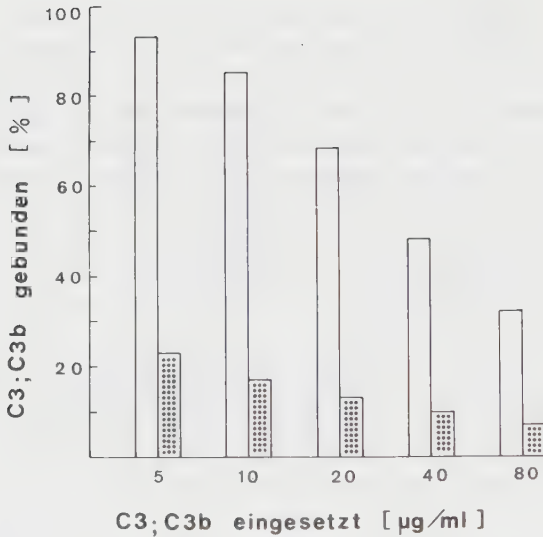


Abb. 50 Vergleichende Darstellung der Bindungskapazität des LPS-R von Ye 75 für C3 und C3b

$^{14}\text{C-C3}$ □

$^{14}\text{C-C3b}$ ▨

Versuchsbedingungen und Bestimmung der gebundenen Proteinmengen wie in Legende zu Abb. 49. Ergebnis von drei Experimenten.

6.3. Bindung von C3 und C3-NH₂OH an LPS-R

Es wurde nun geprüft, ob der interne reaktive Thioester des nativem C3, welcher am C3b fehlt, für die bevorzugte Bindung von C3 an LPS-R verantwortlich war. Für diese Versuche wurde natives C3 mit Hydroxylamin inaktiviert (C3-NH₂OH). Hydroxylamin reagiert bei der Inkubation mit C3 als starkes nukleophiles Reagens mit der Thioestergruppe und wird dort kovalent gebunden (27). Die Bindung von nativem $^{14}\text{C-C3}$ und $^{14}\text{C-C3-NH}_2\text{OH}$ an LPS-R wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration untersucht. Abbildung 51 stellt ein repräsentatives

tives Ergebnis von mehreren Experimenten dar. $^{14}\text{C-C3-NH}_2\text{OH}$ wurde im Vergleich zum nativem $^{14}\text{C-C3}$ in nahezu dem gleichen Umfang an LPS-R gebunden. Lediglich in den absoluten Werten waren geringe Unterschiede zu beobachten, die auf experimentell bedingte Schwankungen zurückzuführen waren.

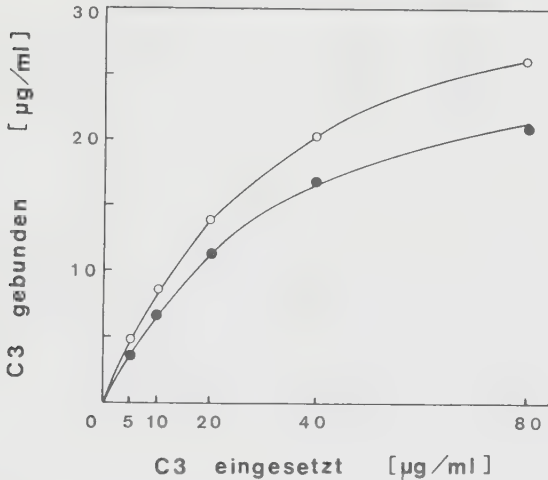


Abb. 51 Bindung von $^{14}\text{C-C3}$ und $^{14}\text{C-C3-NH}_2\text{OH}$ an LPS-R von Ye 75

LPS-R- $^{14}\text{C-C3}$ ○ — ○
LPS-R- $^{14}\text{C-C3-NH}_2\text{OH}$ ● — ●

Versuchsbedingungen und Bestimmung der gebundenen Mengen an $^{14}\text{C-C3}$ wie in Legende zu Abb. 49.

Im Bereich der C3-Sättigung des LPS-R mit 80 µg C3/ml ließ sich aus drei Versuchen eine Bindungskapazität für $^{14}\text{C-C3-NH}_2\text{OH}$ von $21,9 \pm 1,2$ µg/ml und für natives $^{14}\text{C-C3}$ von $23,7 \pm 2$ µg/ml bestimmen. Es konnte somit eine Bedeutung des Thioesters von nativem C3 für seine Bindung an LPS-R

ausgeschlossen werden.

6.4. Freisetzung von C3 aus LPS-R-C3-Komplexen

Die enzymatische Aktivierung von C3 führt zu einer festen Bindung des C3b-Proteins an geeignete Oberflächen. Der Bindungstyp konnte als eine Esterbindung charakterisiert werden, die in Gegenwart von Hydroxylamin oder bei hohen pH-Werten reversibel ist (22,27). Da der Bindung von C3 an LPS-R ein vergleichbarer Reaktionsmechanismus zugrunde liegen könnte, wurde versucht das gebundene C3 mit den bei der C3b-Freisetzung wirksamen Mitteln aus den LPS-R-C3-Komplexen zu lösen.

LPS-R-C3-Komplexe (10 µg ^{14}C -C3/ml; 400 µg LPS-R/ml) wurden mit Hydroxylamin (1 M) bei 37°C für verschiedene Zeiten (60-180 min) inkubiert. Anschließend wurden diese Reaktionsansätze in diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten zentrifugiert und die Sedimentationsgeschwindigkeiten von ^{14}C -C3 aus den Reaktionsansätzen wurden mit der Sedimentation von ^{14}C -C3 verglichen. Eine Spaltung der LPS-R-C3-Komplexe in die einzelnen Komponenten konnte unter diesen Reaktionsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

Weitere Experimente, in denen die LPS-R-C3-Komplexe an Stelle von Hydroxylamin in Gegenwart hoher pH-Werte (0,1M Glycin/NaOH; pH 11) inkubiert wurden, führten ebenfalls zu keiner C3-Freisetzung (Abb. 52). Eine eindeutige Dissoziation der LPS-R-C3-Komplexe trat aber nach Inkubation mit 1% Triton X 100 auf. Die Menge des durch Triton freigesetzten ^{14}C -C3 wurde in Gegenwart hoher pH-Werte noch einmal erhöht (Abb. 52). Die Anwesenheit von Triton X 100 war ausschlaggebend für die Reversibilität der Bindung zwischen C3 und LPS-R. Wie in Tab. 17 zusammengefaßt, wurde ^{14}C -C3 in Abhängigkeit von der Triton-Konzentration aus seiner Bindung mit LPS-R herausgelöst.

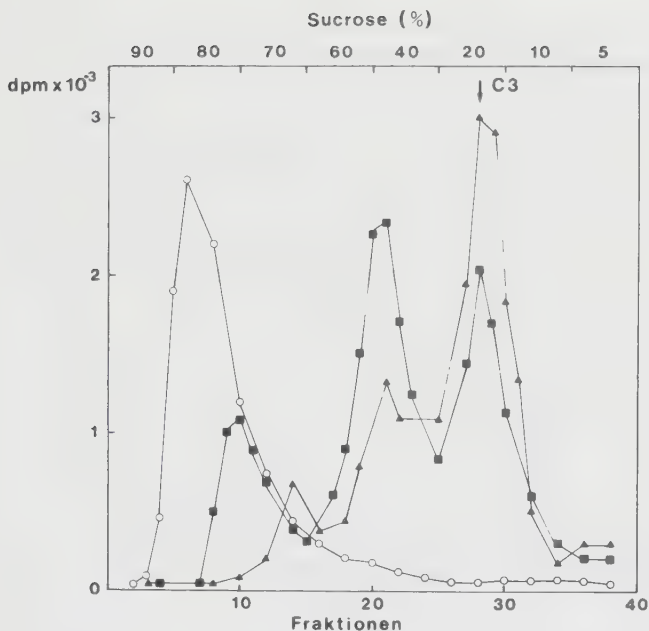


Abb. 52 Freisetzung von ^{14}C -C3 aus LPS-R- ^{14}C -C3-Komplexen

LPS-R-C3 + 0,1 M Glycin/NaOH; pH 11
 LPS-R-C3 + 1% (v/v) Triton X 100
 LPS-R-C3 + 1% (v/v) Triton X 100 +
 0,1 M Glycin/NaOH; pH 11

○ — ○
 ■ — ■
 ▲ — ▲

Die Inkubation der Reaktionsgemische (10 μg ^{14}C -C3/ml; 400 μg LPS-R/ml) erfolgte bei 37°C für 60 min. Die Gradientenzentrifugation erfolgte wie in Legende zu Abb. 48 beschrieben. Der Pfeil (↓) markiert das Sedimentationsgleichgewicht von ungebundenem ^{14}C -C3.

Die maximale Menge des freien ^{14}C -C3 belief sich nach Inkubation mit Triton X 100 (1% v/v) auf ca. 68% der eingesetzten Radioaktivität. Durch Erhöhung des pH-Wertes im Inkubationsgemisch konnte dieser Wert noch auf ca. 83% gesteigert werden.

Es blieb aber immer eine restliche Radioaktivität von 10-15% am LPS-R gebunden.

Tab. 17 Freisetzung von ^{14}C -C3 aus LPS- ^{14}C -C3-Komplexen in Abhängigkeit von der Triton-Konzentration

Triton (%)	eingesetztes C3 (dpm/ml $\times 10^3$)	^{14}C -C3 $\times$	freies C3 (dpm/ml $\times 10^3$)	freies C3 (%)
0	27		3,6	13
0,1	26,9		11,6	43
0,5	27,6		15,6	56
1	27,5		18,8	68
2	27,2		18,9	69

$\times$ ^{14}C -C3 $\hat{=}$ 10 μg Protein/ml

Versuchs- und Inkubationsbedingungen wie in Legende zu Abb.48.

Andere Detergenzien wie Harnstoff (1 M), Desoxycholat (1 M) und SDS (1% w/v) ließen nach Inkubation mit den LPS-R-C3-Komplexen und anschließender Zentrifugation in Sucrose-Gradienten keine Auftrennung in die einzelnen Komponenten erkennen. In der SDS-PAGE ließ sich aber eine Wirkung dieser Detergenzien (SDS, Harnstoff) auf LPS-R-C3-Komplexe nachweisen, da derart behandelte Komplexe unter Freisetzung von C3 dissoziierten (Abb. 44). Vermutlich ermöglichten die beim Eintritt in das Gel auftretenden Scherkräfte eine mechanische Aufspaltung der durch SDS solubilisierten Komplexe.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß nur unter dem Einfluß von starken hydrophoben Reagenzien die Bindung von C3 an LPS-R reversibel war. Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem LPS-R waren daher als Bindungstyp anzunehmen. Der Reaktionsmechanismus, welcher der Bindung von C3 an das LPS der Glattform von Ye 75 zugrunde liegt, konnte in

dieser Arbeit nicht geklärt werden. Komplexe aus LPS-S und C3 waren nicht unter solchen Reaktionsbedingungen dissoziierbar, die zu einer Aufspaltung von LPS-R-C3-Komplexen führten. Daraus folgt, daß ein anderer Bindungstyp bei der Reaktion von C3 mit dem LPS-S zum Tragen kommt.

7. Bildung der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungs-
weges mit LPS-C3- und LPS-C3b-Komplexen

Die Reaktion von C3b mit den Komplementfaktoren D und B des alternativen Weges führt zu einer Aktivierung von B unter Bildung des labilen Mg^{++} -abhängigen Enzymkomplexes $C3bBb$. Dieses Enzym spaltet natives C3 in die Bruchstücke C3a und C3b (29-31). Nachfolgende Experimente sollten nun Aufschluß darüber geben, ob C3 nach Bindung an LPS-R von Ye 75 zur Bildung von $C3bBb$ herangezogen werden kann. In folgenden drei Testsystemen wurde die Bildung des $C3bBb$ -Enzyms untersucht:

1. Lösliches C3b + D + B (Kontrollansatz)
2. LPS-R-C3-Komplexe + D + B
3. LPS-R-C3b-Komplexe + D + B.

In dem Kontrollansatz mit löslichem C3b wurde das Enzym bei 20°C in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen aus den einzelnen Komponenten C3b, D und B geformt. Nach Zugabe von EDTA (5 mM; pH 7,3) wurde die Menge des gebildeten Enzyms durch seine Reaktion mit nativem C3 ermittelt. Die Bestimmung der nicht inaktivierten C3-Moleküle erfolgte im hämolytischen Testsystem. In den Testansätzen 2 und 3 wurde das lösliche C3b durch LPS-R-C3- bzw. LPS-R-C3b-Komplexe ersetzt. Für die Bildung von LPS-R-C3-Komplexen wurde LPS-R mit Konzentrationen von ^{14}C -C3 inkubiert, welche eine Sättigung des LPS-R mit dem Protein gewährleisteten. Anschließend wurden die LPS-R-C3-Komplexe in Sucrose-Gradienten aufgetrennt. Die isolierten LPS-R-C3-Komplexe wurden durch Dialyse gegen PBS-Puffer (10 mM KPO_4 /150 mM NaCl; pH 7,0) von der Sucrose befreit und auf eine Proteinkonzentration von 100 μg ^{14}C -C3/ml eingestellt.

Zur Bildung von LPS-R-C3b wurden die LPS-R-C3-Komplexe mit Trypsin inkubiert (s. Methoden 6.). In Abb. 54 a und b sind die Ergebnisse dargestellt. Mit dem LPS-R-C3b konnte eine sofortige Bildung von $\overline{\text{C3bBb}}$ induziert werden, wobei die maximale Aktivität des Enzymkomplexes aber geringer als in der Kontrolle war.

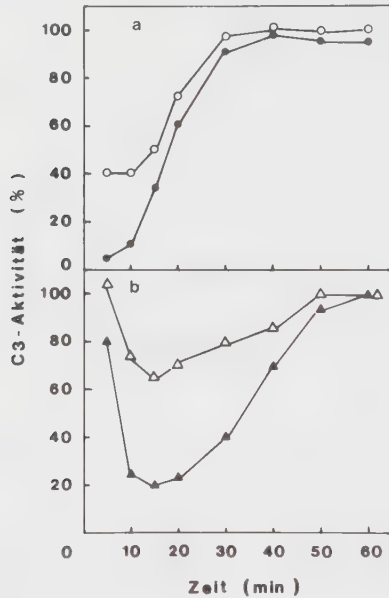


Abb. 54 Bildung von $\overline{\text{C3bBb}}$ mit LPS-R-C3-Komplexen

- a. $^{14}\text{C-C3b}$ (4 μg Protein/ml) ●—●
 $^{14}\text{C-C3b-LPS-R}$ (4 μg Protein/ml) ○—○
- b. $^{14}\text{C-C3}$ (4 μg Protein/ml) ▲—▲
 $^{14}\text{C-C3-LPS-R}$ (4 μg Protein/ml) △—△

Versuchs- und Inkubationsbedingungen zur Enzymbildung siehe Methoden (3.3.).

Parallel zur Kontrolle verringerte sich nach einer Inkubationszeit von 10 min die Enzymaktivität. Vollständige Inaktivierung der C3-Konvertase lag nach einer Inkubationszeit von 30 min vor. Mit den LPS-R-C3-Komplexen ließ sich ebenfalls eine aktive C3-Konvertase induzieren. Die maximale Enzymaktivität, welche erst nach 10-15 min Inkubationszeit erreicht wurde, war deutlich geringer als in den Ansätzen mit C3b und LPS-R-C3b.

Die Ursache für die geringere Enzymaktivität in Gegenwart von LPS-R-C3- und auch von LPS-R-C3b-Komplexen war Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es wurde verglichen, in welchem Ausmaß lösliches C3b und LPS-C3-Komplexe zu einem Verbrauch von Faktor B durch enzymatische Aktivierung führten. Dazu wurden Reaktionsansätze aus D, B und LPS-R-C3-Komplexen, LPS-R-C3b-Komplexen oder löslichem C3b für 60 min bei 20°C inkubiert und anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Abb. 55. Die Aktivierung von Faktor B in Gegenwart der LPS-R-C3- und LPS-R-C3b-Komplexe (Bahn 4 und 5) war unvollständig, da noch eine Proteinbande mit der gleichen relativen Mobilität wie die des nativen B (Bahn 1 und 4) zu erkennen war. Daneben traten zwei weitere Banden auf, die denen des in Gegenwart von löslichem C3b vollständig aktivierten B entsprachen (Bahn 2). Die verminderte Bildung der C3-Konvertase mit LPS-R-C3/C3b-Komplexen war somit auf eine geringe Aktivierung von Faktor B zurückzuführen.

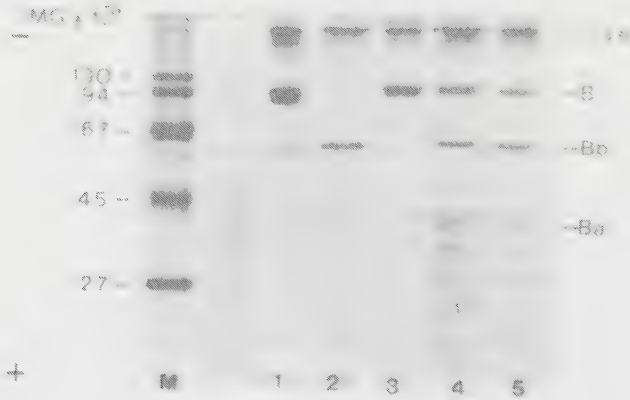


Abb. 55 SDS-PAGE von Reaktionsgemischen aus LPS-R-C3/C3b-Komplexen, Faktor B und D, in einem 10%igen Gel

Bahn:

1. C3b + B
 2. C3b + B + D
 3. C3b + B
 4. LPS-R-C3 + B + D
 5. LPS-R-C3b + B + D
- M. Referenzproteine, je 10 µg, reduziert;
(wie in Legende zu Abb. 22)

Die Reaktionsansätze wurden entsprechend den Angaben in Legende zu Abb. 54 hergestellt und für 60 min bei 20°C inkubiert. Jeweils zehn dieser Gemische wurden dann in Kollodiumhülsen auf 0,2 ml ankonzentriert. Nach der Denaturierung (s. Methoden 10.1.) wurden je 50 µl auf das Gel aufgetragen.

Die deutliche Hemmwirkung von LPS-R-C3/C3b-Komplexen auf die Aktivierung von B führte zu der Frage, ob LPS-R seinen hemmenden Einfluß auch dann ausübt, wenn es dem Kontrollansatz aus C3b, B und D zugemischt wird. In diesem Ansatz führte die Inkubation von C3b, B und D mit steigenden Konzentrationen des LPS-R von Ye 75 zu einer Inhibition der $\overline{\text{C3bBb}}$ -Bildung (Abb. 56).

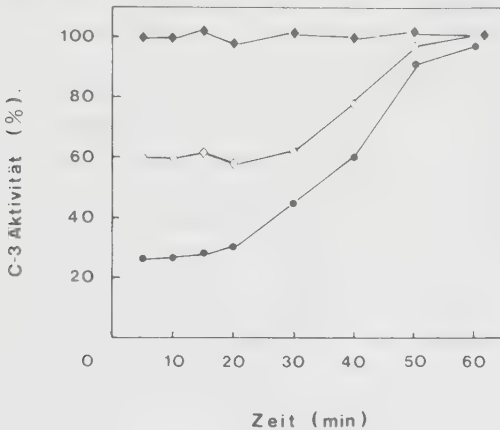


Abb. 56 Bildung von $\overline{\text{C3bBb}}$ in Gegenwart des LPS-R von Ye 75

Den Reaktionsansätzen aus C3b (2 µg), D und B wurde unmittelbar vor der Inkubation 40 µg LPS-R (◇—◇) und 80 µg LPS-R (◆—◆) zugesetzt; Kontrolle ohne LPS (●—●). Versuchs- und Inkubationsbedingungen siehe Methoden (3.3.).

Mit 80 µg LPS-R im Reaktionsansatz konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden. Es ließ sich somit demonstrieren, daß der inhibitorische Einfluß von LPS auch in einem komplexen System von Proteinen wirksam wurde.

III. DISKUSSION

Zur Reinigung und Charakterisierung von C3 und C5 vom Meerschweinchen

Proteinchemische reine Präparate von C3 und C5 aus Meerschweinenserum wurden erstmals von SHIN und MAYER (84) bzw. von BITTER-SUERMAN et. al. (85) Ende der sechziger Jahre beschrieben. In der nachfolgenden Zeit wurden weitere Methoden zur Reinigung dieser Proteine ausgearbeitet, die in der Mehrzahl nur geringe Ausbeuten an funktionell aktivem Protein erzielten (86-88). Das in dieser Arbeit entwickelte Reinigungsverfahren, welches sich an das jüngst beschriebene Vorgehen für die Isolierung von humanem C3 und C5 anlehnt (89), ermöglichte eine hohe Ausbeute an funktionell aktivem C3 bzw. C5 aus Meerschweinenserum. Das Reinigungsschema für C3 und C5 umfaßte zunächst gemeinsame Schritte, welche eine fraktionierte Fällung mit Polyethylenglycol, Affinitätschromatographie mit Lysin-Sepharose 4 B und DEAE-Sepacel-Chromatographie beinhalten (Schema 1). Mit letzterem Chromatographieschritt gelang die vollständige Trennung von C3 und C5 (Abb. 5); über die Anwendung weiterer Chromatographieschritte wurde dann jede Komponente für sich isoliert (Schema 1). Die Ausbeute in Bezug auf die funktionelle Aktivität betrug 55% für C3 (Tab. 3) und 13% für C5 (Tab. 4). Hochgereinigtes C3 hatte eine spezifische Aktivität von $10,2 \times 10^{10}$ eff.Mol./mg, was letztlich einem Anreicherungsfaktor von 87 entsprach. Das gereinigte C5 wies bei einem Anreicherungsfaktor von 258 eine spezifische Aktivität von 19×10^{12} eff.Mol./mg auf. Der große Unterschied in der spezifischen Aktivität beider Proteine läßt sich auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der hämolytischen Testsysteme für C3 bzw. C5 zurückführen. Die proteinchemische Reinheit der isolierten Komponenten C3 und C5 wurde unter Anwendung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) überprüft. Beide Komponenten zeigten sowohl in

der Disk-PAGE (Abb. 8 und Abb. 14), als auch in der SDS-PAGE (Abb. 9 und Abb. 15) eine einzige, färbereichs darstellbare Bande. Ein weiterer Reinheitsnachweis wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit C3 und C5 erbracht. Nach mehrfacher Injektion von C3 oder C5 in einer Gesamtdosis von je 300 µg gelang die Gewinnung von monospezifischem Anti-C3 (Abb. 10) und auch Anti-C5 (Abb. 16). Die immunoelektrophoretischen Untersuchungen ergaben mit Anti-C3 identische Präzipitationslinien für Serum-C3 und gereinigtes C3. Überraschenderweise präzipitierte aber Anti-C5 das gereinigte C5 in einer Position, welche gegenüber dem Serum C5 deutlich anodisch verschoben war (Abb. 16). Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß die Anwendung der verschiedenen Reinigungsmethoden zu einer Veränderung der C5-Moleküle führte, welche sich in einer Ladungsänderung äußert. Eine solche Änderung wäre durch Abspaltung von Zuckerresten möglich, welche bei allen Komplementkomponenten einen mehr oder weniger großen Anteil der Moleküle ausmachen (90).

Gereinigtes C3 und C5 wurden in Hinblick auf Molekulargewicht und Untereinheiten näher charakterisiert, so daß ein Vergleich mit den entsprechenden humanen Komponenten möglich wurde (Tab. 18). Für das C3-Protein des Meerschweinchens wurde ein etwas geringeres Molekulargewicht als für humanes C3 gefunden. Dieser Unterschied, welcher sich aus einer kürzeren β -Kette beim Meerschweinchen-C3 erklärt, wurde auch in einer soeben publizierten Arbeit gefunden (91). Ferner ließ sich erstmals zeigen, daß die Hitzebehandlung oder alkalische pH-Werte bei der Denaturierung zu einer Spaltung der α -Kette in α_1 - und α_2 -Bruchstücke führte (Tab. 6 und Abb. 21). Die Summe der Molekulargewichte beider Spaltprodukte (α_1 : 72000; α_2 : 47700) ergab approximativ 120000, was letztlich der Größe der α -Kette von C3 entsprach. Unter ähnlichen Bedingungen war früher eine Spaltung der α -Kette von humanem C3 beobachtet worden (92). Die in Tabelle 18

Tab. 18 Molekulargewichte und S-Werte von C3 und C5 und deren Untereinheiten

Komponente	MG	S _{20,w} ^o	Untereinheiten	und deren MG
C3	176500 ^{XX} (180000 ^{XXX} bis ^{XXX} 235000)	8,4 ^{XX} (9,5) ^{XXX}	α -Kette	12000 ^{XX} (115000) ^{XXX}
			β -Kette	62300 (75000)
			α_1 -Kette	72000 (74000)
			α_2 -Kette	47700 (46000)
C5	191500 (180000 bis 206000)	8,7 (8,7)	α -Kette	122000 (141000)
			β -Kette	82000 (83000)
			α_1 -Kette	86000 (119000)
			α_2 -Kette	77000 (109000)

^X Die Bezeichnung Untereinheit steht für die nach Reduktion der Disulfidbrücken
entstehenden Polypeptidketten α und β , sowie für die durch Zerfall der
 α -Kette gebildeten Fragmente α_1 und α_2 .
^{XX} Werte aus den eigenen Untersuchungen mit C3 und C5 vom Meerschweinchen.
^{XXX} In Klammern: Werte für humanes C3 und C5 aus der Literatur (74, 92, 94, 95).

zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, eine große Ähnlichkeit in den Molekulargewichten der jeweiligen α -Fragmente von beiden Spezies.

Für gereinigtes C5 des Meerschweinchens wurde in den eigenen Versuchen (Tab. 18) und auch in der Literatur (93) ein etwas höheres Molekulargewicht als für C3 gefunden. Ein vergleichbarer Größenunterschied scheint auch für humanes C3 und C5 gesichert, obwohl die publizierten Daten erheblich voneinander abweichen (74, 94, 95). Die SDS-PAGE von Meerschweinchen C5 erbrachte nach Reduktion des Proteins vier Proteinbanden, denen Molekulargewichte von 122000 (α -Kette), 82000 (β -Kette), 86000 (α_1 -Kette) und 77000 (α_2 -Kette) zugeordnet wurden (Tab. 18). Die Möglichkeit, daß die Banden α_1 und α_2 , welche nach Reduktion zwischen der α - und β -Kette im Gel auftraten (Abb. 23), auf eine Kontamination des C5 mit Fremdprotein zurückzuführen waren, konnte durch die immunoelektrophoretische Analyse ausgeschlossen werden. Für die Fragmentierung der α -Kette spricht das große Molekulargewicht von α_1 und α_2 , welches in beiden Fällen das der β -Kette übertrifft. Ähnliche Bruchstücke wurden auch für humanes C5 beschrieben (74). Auch dort wurde ihre Herkunft durch Spaltung der α -Kette über einen noch unbekannten Mechanismus erklärt. Die Denaturierungsbedingungen hatten in den eigenen Untersuchungen mit Meerschweinchen C5 interessanterweise keinen besonderen Einfluß auf die Bildung von α_1 und α_2 . Offensichtlich war nur ein geringer, kaum veränderbarer Anteil der α -Kette anfällig für die Zerlegung in die entsprechenden Bruchstücke.

Zur Bildung von LPS-C3-Komplexen

In den beschriebenen Experimenten konnte die Ursache für die Hemmung der hämolytischen C3-Aktivität in Gegenwart von LPS eindeutig aufgeklärt werden. Durch Bindung an LPS wird C3 aus

der löslichen Phase entfernt. Am LPS fixiertes C3 steht nicht mehr für die Reaktion in der Komplementsequenz zur Verfügung.

Die Bildung von LPS-C3-Komplexen wurde in der Immunelektrophorese, in der PAGE sowie durch Dichtegradientenzentrifugation nachgewiesen. In der Immunelektrophorese konnte gezeigt werden, daß durch die Bindung von C3 an LPS die elektrophoretische Mobilität von C3 verändert wurde. Auffällig war in diesen Experimenten, daß die Wanderungsrichtung des gebundenen C3 von dem jeweiligen LPS sehr stark beeinflusst wurde. Nach der Bindung an das LPS von Yersinia enterocolitica in Glattform (LPS-S) war die Präzipitationslinie zur Kathode hin verschoben (Abb. 45 c), während C3 durch die Bindung an das LPS von Yersinia enterocolitica in Rauform (LPS-R) mehr im Bereich der Anode präzipitierte (Abb. 45 b). Dieser Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität der LPS-R-C3- bzw. LPS-S-C3-Komplexe läßt sich auf die verschiedenartige Ladung der LPS-Präparationen zurückführen. Inzwischen gilt nämlich als gesichert, daß das LPS von Rauformen mehr negative Ladungen aufweist als das LPS von Glattformen (GALANOS, pers. Mitteilung).

Mit der analytischen Disk-Elektrophorese, bei welcher die Trennung von Proteinen sowohl nach Größe als auch nach Bruttoladung erfolgt, ließ sich nach unspezifischer Proteinfärbung wiederum zeigen, daß die elektrophoretische Beweglichkeit von C3 nach Bindung an LPS im Vergleich zu ungebundenem C3 deutlich verändert war. Hierbei wirkten sich die verschiedenen LPS-Formen ebenfalls unterschiedlich aus. Die breite und unscharfe Zone des angefärbten C3 nach seiner Reaktion mit LPS-R deutete bereits daraufhin, daß die LPS-R-C3-Komplexe in ihrer Ladung und Größe sehr heterogen sein mußten (Abb. 43). Nach der Bindung an LPS-S färbte sich C3 dagegen als relativ homogene Bande im Gel an (Abb. 43). Hier wies lediglich eine zweite Bande an der Oberkante des

Gels auf eine gewisse Heterogenität innerhalb der LPS-S-C3-Komplexe hin.

Diese Ergebnisse konnten in der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation bestätigt werden. Die Bindung von C3 an LPS äußerte sich in einer Zunahme der Sedimentationsgeschwindigkeit im Vergleich zu freiem C3. Die LPS-S-C3-Komplexe sedimentierten im Gradienten relativ homogen und hatten eine deutlich geringere Sedimentationsgeschwindigkeit als die LPS-R-C3-Komplexe (Abb. 40). Letztere wiesen in ihrem Sedimentationsverhalten einen partikulären Charakter auf. Nur nach intensiver Vorbehandlung des LPS-R mit Ultraschall war eine Gleichgewichtssedimentation von LPS-R-C3-Komplexen im linearen Sucrose-Gradienten möglich. Da durch eine derartige Vorbehandlung der aktuelle physikalische Aggregationszustand von LPS-R verändert wird (96), konnte dieses Ergebnis nur bedeuten, daß die Größe der LPS-R-C3-Komplexe durch deren Aggregationsgrad bestimmt wurde. Die besondere Aggregationsneigung von LPS und deren Bedeutung für die Reaktion mit C3 wird im nächsten Abschnitt besprochen.

Die Untersuchungen mit der Dichtegradientenzentrifugation ergaben als weiteres Ergebnis, daß die Hemmung von C3 durch LPS immer mit einer Zunahme der Sedimentationsgeschwindigkeit von C3 einherging (Abb. 46). In Ansätzen aus LPS und C3, welche nicht zu einem Verlust der hämolytischen C3-Aktivität führten, war auch das Sedimentationsverhalten von C3 unverändert (Abb. 46). Diese Versuche erlaubten den Schluß, daß ausschließlich die C3-Bindung an LPS für die Hemmwirkung von LPS auf hämolytisches C3 verantwortlich war.

Der Nachweis einer Komplexbildung zwischen dem C3-Protein und extrahiertem LPS steht im Einklang mit früheren Untersuchungen von SKARNES et. al. (97), die gezeigt haben, daß LPS sowohl in vivo als auch in vitro mit Lipoproteinen des Plasmas Komplexe bildet. In anderen Untersuchungen über die

Reaktion von LPS mit C1 führte die Bindung von C1 an LPS zu einem Verlust der hämolytischen C1-Aktivität (69).

Zum Einfluß des Aggregationszustandes auf die C3-Bindung an LPS

Die eigenen Untersuchungen zeigten eindeutig, daß die Bindungsfähigkeit des LPS-S und LPS-R von Yersinia enterocolitica für C3 wesentlich von dem physikalischen Zustand der LPS-Präparationen beeinflußt wurde. Als frisch aufgelöstes Lyophilisat verhielt sich das LPS-S auch unter Ladungsveränderungen im Reaktionsansatz vollkommen inert gegenüber C3 (Abb. 27). Erfolgte dagegen die Aufbereitung des LPS-S mit Triethylamin (TEA), so ermöglichte dies die Bindung von C3 (Abb. 33). Diese so erzielte Bindungsbereitschaft war aber nicht auf eine chemische Modifikation am LPS-Molekül zurückzuführen, da der reaktive Zustand des LPS durch Lagerung bei 4°C oder durch Einfrieren wieder verloren ging (Abb. 33). Diese Beobachtung konnte nur bedeuten, daß der jeweilige physikalische Zustand des LPS-S für die Reaktion mit C3 von Bedeutung war. Untersuchungen über die Wirkung von TEA auf den physikalischen Zustand von LPS wurden von GALANOS und LÜDERITZ (81, 82) beschrieben. Die Autoren konnten zeigen, daß durch TEA eine chemische Desaggregation hervorgerufen wird, wobei LPS von einem hochmolekularen, aggregierten Zustand in eine niedermolekulare Form übergeht. Sie beobachteten weiterhin, daß diese niedermolekulare Form durch Lagerung oder durch Zugabe von divalenten Kationen wieder reaggregiert. Die in dieser Arbeit getroffenen Untersuchungsergebnisse erlaubten somit die Schlußfolgerung, daß das LPS-S nur in einer desaggregierten Form C3 zu binden vermochte. Auffällig war, daß die Bindung des C3 durch eine Zugabe von divalenten Kationen (Ca^{++}) beschleunigt bzw. die Effizienz der Bindung erhöht werden konnte (Abb. 33). Dieser, die Reaktion fördernde Einfluß von Ca^{++} war aber längst nicht

so ausgeprägt wie beim LPS-R (s. unten).

Das LPS-R war als frisches Lyophilisat ebenfalls nicht fähig, eine Bindung mit C3 einzugehen. Hier bedurfte es allein der Zugabe von divalenten Kationen, ohne die Aufbereitung des LPS-R mit TEA, um die C3-Bindung zu vermitteln (Abb. 33). Die Wirkung der divalenten Kationen auf LPS ist der des TEA genau entgegengesetzt, da divalente Kationen wie z.B. Ca^{++} eine Reaggregation der LPS-Stränge vermitteln. Man nimmt an, daß die Ca^{++} -Ionen hierbei eine Verbindung zwischen den negativ geladenen Phosphat- und Carboxylgruppen herstellen und so gemeinsam mit hydrophoben Kräften den Aggregationsprozeß einleiten. Molekulargewichtsbestimmungen bestätigten diese Annahme, da sich durch Zusatz von Ca^{++} -Ionen das Molekulargewicht von LPS stark erhöht (96). In Bezug auf die Reaktion zwischen C3 und LPS-R war daher zu folgern, daß ohne TEA gelöstes LPS-R wenigstens teilweise in desaggregierter Form vorlag und daß die Bindung während oder nach Induktion des Aggregationsprozesses durch Zugabe von Ca^{++} -Ionen eintrat.

Elektronenoptische Untersuchungen bestätigten die Annahme verschiedener Aggregationszustände in beiden LPS-Präparationen. Hier zeigte sich, daß das LPS-S ohne chemische oder physikalische Vorbehandlung stark strukturierte, micellenartige Strukturen ausbildete, die einen hohen Aggregationszustand aufwiesen (Abb. 29 a). Bruchstücke von Einzelsträngen bzw. Einzelstränge, deren Längsfibrillen dissoziiert waren, wiesen demgegenüber beim LPS-R auf eine geringere Aggregation hin (Abb. 29 b). Die Behandlung mit TEA führte bei beiden LPS-Präparationen zu einer Zerstörung dieser Strukturen unter Entstehung von relativ homogenen Gebilden, die in Abhängigkeit von der LPS-Form als kleine Komplexe oder als kleine Bruchstücke von LPS-Strängen erschienen (Abb. 30). In Gegenwart von Ca^{++} -Ionen trat dann bei beiden LPS-Präparationen eine Reaggregation ein, die zu definierten LPS-

Strängen führte (Abb. 31). Die elektronenoptischen Untersuchungen belegten somit die zuvor gemachte Annahme, daß reaktionsfähiges LPS in einem mehr oder weniger desaggregierten Zustand vorlag. Desaggregiertes LPS-S zeigte eine zwar labile, aber prompte Reaktionsfähigkeit mit C3, welche durch Ca^{++} -Ionen noch gefördert wurde. Im Gegensatz dazu wies auch ein vollständig desaggregiertes LPS-R niemals ein sofortiges Reaktionsvermögen mit C3 auf. Erst in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen erfolgte hier der Übergang in die reaktionsfähige Form. Daraus folgt, daß der Zustand der Desaggregation beim LPS nicht regelmäßig eine Bindungsfähigkeit für C3 gewährleistet. Faktoren wie Ca^{++} -Ionen haben zusätzlich einen modulierenden oder auch entscheidenden Einfluß, wobei Aussagen über den Wirkungsmechanismus in Bezug auf die C3-Bindung derzeit nicht möglich sind.

In den gleichen elektronenoptischen Untersuchungen erwies sich der Vorgang der C3-Bindung an LPS-S oder LPS-R als ein aggregationshemmendes Element (Abb. 32). Möglicherweise wird C3 an Strukturbereiche des LPS-Moleküles gebunden, die üblicherweise die Reaggregation vermitteln. Man nimmt an, daß hierfür im wesentlichen die negativ geladene KDO-Lipoid-A-Region zuständig ist, wobei hydrophobe Wechselwirkungen und divalente Kationen den Aggregationsprozeß ermöglichen (96). Die elektronenoptischen Untersuchungen zeigten, daß der physikalische Zustand des LPS durch Proteinbindung erheblich beeinflusbar ist. Es bleibt zu untersuchen, ob eine derartige LPS-Protein-Interaktion auch biologische Eigenschaften von LPS verändern kann.

Zum Bindungsort von C3 an LPS

Eine Reihe von Lipopolysacchariden mit unterschiedlichem strukturellen Aufbau wurden auf ihr Reaktionsverhalten gegenüber C3 analysiert. Dabei sollte geprüft werden, welche

Bedeutung die Lipoid A-Region und die Polysaccharidregion des LPS für die C3-Bindung haben. Die Untersuchungen ergaben folgendes Bild: Von sechs getesteten LPS-Präparationen von Glattstämmen mit vollständigen Polysaccharidketten waren zwei direkt und vier nach TEA-Behandlung in der Lage, C3 zu binden (Tab. 11, 12). Die LPS-Präparationen von zwei R-Formen, die zwar noch die Zucker des Kernoligosaccharids enthielten, denen aber die O-spezifischen Seitenketten fehlten, konnten zwar C3 binden, wiesen hierbei aber eine starke Abhängigkeit für divalente Kationen (Ca^{++}) auf (Tab. 12). Das LPS einer Re-Form, welches durch den Verlust weiterer Zuckerbestandteile nur aus KDO, Lipoid A und Glucosamin bestand, benötigte keinen Zusatz von Ca^{++} -Ionen für die C3-Bindung (Tab. 12).

Dieses Reaktionsverhalten von LPS-Präparationen mit zunehmendem Defekt in der Polysaccharidkette läßt die Aussage zu, daß der Bindungsort von C3 am LPS-Molekül im Bereich Lipoid A-Region liegt. Hierfür spricht insbesondere die Bindung von C3 an das LPS der Re-Form, da hier die Bindung ohne jegliche Veränderung des LPS eintrat. Nahm dagegen der Zuckeranteil in der Seitenkette beim LPS der R- oder S-Form zu, so war zunächst in den meisten Fällen die Anlagerung von C3 verhindert. Der reaktionsfördernde Einfluß der divalenten Kationen bzw. der Desaggregation mit TEA ist dann vermutlich in einer Freilegung dieses Reaktionsortes für C3 zu sehen. Die Frage, inwieweit Lipoid A allein für die Bindung des C3 verantwortlich war, wurde mit isoliertem Lipoid A analysiert, welches durch sukzessive alkalische und saure Hydrolyse aus LPS gewonnen worden war. Hier zeigte sich, daß C3 an isoliertem Lipoid A nicht gebunden werden konnte (Tab. 13). Aus dem Verlust der Bindungsfähigkeit des LPS-Re nach den Hydrolyseschritten wurde besonders deutlich, daß der gesamte Lipoid A Bereich, bestehend aus den drei KDO Einheiten, dem Lipoid A und den estergebundenen Fettsäuren, für die Bindung von C3 an LPS benötigt wurde.

In anderen Untersuchungen über die Komplexbildung zwischen dem LPS einer Rauhmutter von S. typhimurium mit Polymyxin B konnte ebenfalls festgestellt werden, daß der Bindungsort des Polymyxin B im Bereich der negativ geladenen KDO-Lipoid A-Region liegt (98). Die Reaktion war pH-abhängig und erfolgte nur in Gegenwart von divalenten Kationen. Dieses Reaktionsverhalten entspricht vollkommen der C3-Bindung an LPS-R von Yersinia enterocolitica und unterstützt somit die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse, mit denen die Lipoid A-Region als Reaktionsort zwischen C3 und LPS identifiziert wurde.

Obwohl für das LPS-S wie auch für das LPS-R ein gleicher Bindungsort für C3 innerhalb des LPS-Moleküles anzunehmen war, unterschieden sich die beiden LPS-Präparate merklich in ihren Bindungseigenschaften. Dies äußerte sich sowohl in Experimenten zur Kinetik der C3-Bindung, in denen das LPS-S eine deutlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufwies, als auch in Untersuchungen zur C3-Bindungskapazität. Einen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis bei diesen Untersuchungen hatte die Aufbereitung des LPS mit TEA. So konnte festgestellt werden, daß bei steigender TEA-Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit für beide LPS-Präparationen erhöht wurde (Tab. 9). Die Bindungskapazität des LPS-S nahm dabei zu, wohingegen die des LPS-R gesenkt wurde (Tab. 10). Dies bedeutete für das LPS-S, daß Desaggregation mit TEA nicht nur die Bindungsfähigkeit ermöglichte, sondern daß die chemische Veränderung des LPS-S direkt an der Bindungsreaktion beteiligt war. Möglicherweise wurden durch die Behandlung mit TEA zusätzlich reaktive Gruppen in das LPS-Molekül eingebracht, die dann mit C3 reagierten. Für die Abnahme der Bindungskapazität von LPS-R lassen sich zwei Erläuterungen anführen. Zum einen könnte die intensive Desaggregation den für die Bindung notwendigen Reaggregationsprozeß inhibieren, zum anderen könnte eine Abspaltung von ester gebundenen Fett-

säuren auftreten (GALANOS, pers. Mitteilung), welche wiederum die C3-Bindungsfähigkeit im Bereich der Lipoid A-Region vermindert.

Zum Bindungsmechanismus von C3 an LPS

In Experimenten zur Bindungskapazität wies das LPS-R ein interessantes Reaktionsverhalten gegenüber C3 auf. Eine konstante Menge LPS-R war nämlich in der Lage, bei steigender Konzentration an hämolytisch aktivem C3 eine zunehmende Menge von C3 zu binden (Abb. 49). Hierbei wurde für 200 µg LPS-R ein Sättigungswert entsprechend einer gebundenen Menge von ca. 25 µg C3 bestimmt. Dagegen lag der Sättigungswert für das Spaltprodukt C3b bei nur 7 µg C3b pro 200 µg LPS-R, welches einer Reduktion um 72% gegenüber der Bindung von nativem C3 entspricht. Zugleich wurde in einem kinetischen Experiment festgestellt, daß die Bindung von C3 vollkommen parallel zur hämolytischen Inaktivierung verlief (Abb. 48). Diese Ergebnisse ließen zunächst die Vermutung zu, daß die Bindung von C3 durch einen Aktivierungsprozeß und Hydrolyse des intramolekularen Thioesters hervorgerufen wurde.

Zum besseren Verständnis der aufgrund dieser Überlegung durchgeführten Experimente werden im folgenden einige theoretische Erläuterungen gegeben. C3 besitzt, wie in Abb. 57 dargestellt, als hämolytisch aktives Molekül einen intramolekularen Thioester. Während der Spaltung des Moleküls in C3a und C3b durch die C3-Konvertasen ($C4_2$, $C3bBb$) oder durch eine Reihe von Proteasen (z.B. Trypsin, Plasmin) wird dieser Thioester am C3b-Fragment in hochreaktiver Form exprimiert. Erfolgt eine sofortige Hydrolyse durch H_2O , so entsteht inaktiviertes C3b (C3bi). Eignet sich die Spaltung aber an Oberflächen, so ergibt sich aus der Hydrolyse des Thioester eine Esterbindung zwischen C3b und OH-Gruppen der betreffenden Oberfläche (22-27). In den vergleichenden Bindungsstudien mit C3

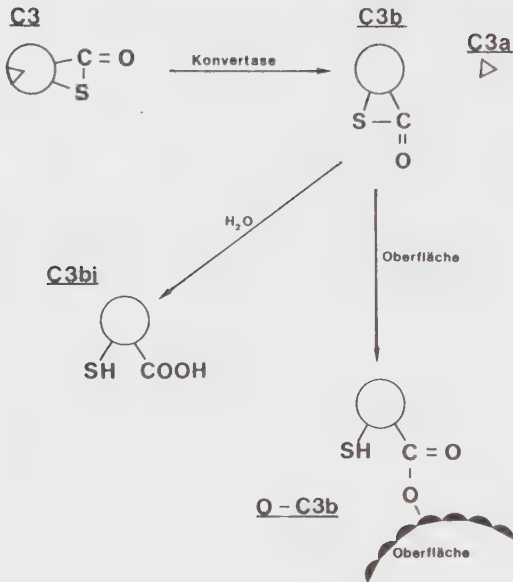


Abb. 57 Intramolekularer Thioester im C3-Molekül. Exposition nach Abspaltung von C3a im C3b-Fragment und Reaktion mit Wasser (C3bi) oder Oberflächen-OH-Gruppen (O-C3b)

und dem durch Trypsinspaltung gewonnenen löslichen C3bi lag also der Unterschied in dem einerseits noch vorhandenen (C3) und andererseits schon hydrolysierten Thioester (C3bi). Hieraus ergab sich die Frage, ob die Bindung an das LPS-R, die vornehmlich mit dem nativen C3 stattfand, durch die Hydrolyse des Thioesters zustande kam. Diese Überlegungen wurden zudem noch unterstützt durch eine Reihe von Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, daß der Thioester im C3 auch ohne Abspaltung von C3a hydrolysiert und so z.B. eine Esterbindung zwischen C3 und Zuckermolekülen ermöglicht (99).

Weiterhin unterliegt C3 in der löslichen Phase einer spontanen Hydrolyse, die dann zu C3i führt (Abb. 58).

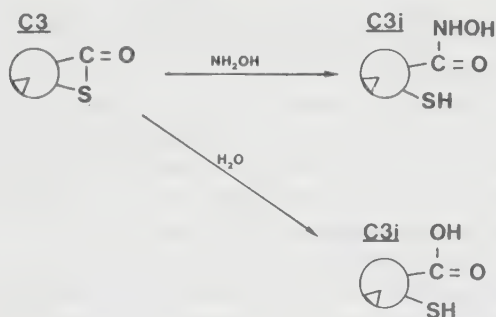


Abb. 58 Hydrolyse des intramolekularen Thioesters von C3 durch Wasser (C3i) oder nukleophile Agenzien (C3i; C3-NH₂OH)

Neben dieser Esterbindung ist theoretisch als weitere Reaktion die Amidbindung möglich, wobei die Amine als nukleophile Agenzien direkt mit nativem C3 reagieren können. Abbildung 58 zeigt eine solche Reaktion am Beispiel des Hydroxylamin. Untersuchungen mit Hydroxylamin ermöglichten auch den experimentellen Nachweis, daß die Bindung zwischen C3 und LPS-R nicht durch die Hydrolyse des Thioesters hervorgerufen wurde. In vergleichenden Experimenten wurden nämlich natives C3 und Hydroxylamin-behandeltes C3 (C3-NH₂OH) in nahezu gleichem Umfang an LPS-R gebunden (Abb. 51). Hierdurch ließ sich definitiv eine Amidbindung zwischen C3 und LPS-R ausschließen; auch eine Esterbindung war bei diesem experimentellen Ergebnis unwahrscheinlich. Bestätigt wurden diese Befunde durch weitere Untersuchungen, in denen keine C3-Freisetzung unter Reaktionsbedingungen eintrat, die üblicherweise zur Aufspaltung einer Esterbindung führen.

Eine Aufklärung des Bindungsmechanismus wurde daraufhin mit Experimenten versucht, welche sich mit der Ablösung des an LPS-R gebundenen C3 befaßten. Ionenbindungen sind schon durch milde, nicht denaturierende Bedingungen wie Änderung des pH-Wertes oder Zugabe chelatbildender Reagenzien (z.B. EDTA) zu lösen. In der größeren Anzahl der Fälle sind Proteine aber durch eine Kombination von ionischer und hydrophober Bindung an Membranen angeheftet. Entsprechend der größeren Festigkeit dieser kombinierten Bindung sind drastische Maßnahmen zu ihrer Lösung erforderlich. Hierzu zählt die Anwendung von nichtionischen und ionischen Detergenzien (100). Eine Ablösung von C3 aus LPS-R-C3-Komplexen trat erst nach Behandlung mit Triton X 100 ein und wurde zusätzlich noch durch Erhöhung des pH-Wertes forciert (Abb. 52). Daraus folgt, daß die Bindung zwischen C3 und LPS-R überwiegend einen hydrophoben Charakter hat und von erstaunlicher Festigkeit ist. Dies wird unterstrichen durch Experimente, in denen eine Solubilisierung und Ablösung des C3 von LPS-R in Gegenwart von SDS nur dann eintrat, wenn zusätzlich noch ein mechanischer Trenneffekt auf die Reaktionspartner wirksam wurde (Abb. 44).

Die kovalente Bindung ist zweifellos eine wesentliche Reaktion bei der Interaktion zwischen C3b und verschiedenen Oberflächen. Ein zusätzlicher hydrophober Bindungsmechanismus zwischen C3 und entsprechenden Oberflächen könnte ferner dazu dienen, ein geeignetes Milieu für die Esterbindung zu schaffen. Ein lokaler Ausschluß von Wasser würde einerseits die benötigte Energie für die Bildung der Esterbindung mit freien -COOH- und -OH-Gruppen senken oder andererseits den Thioester im C3-Molekül vor einer spontanen Hydrolyse schützen. Hiermit wäre die Übertragung der Acyl-Gruppe auf die Oberfläche äußerst effizient und C3b könnte in erhöhter Konzentration gebunden werden. Diese Überlegungen stehen in Einklang mit Untersuchungen von CAPEL et. al. (101), in denen gezeigt wurde, daß die kovalente Bindung von C3b an Sepharose

in Gegenwart von nichtionischen Detergenzien gesteigert werden kann.

Untersuchungen zur Spezifität der hier aufgezeigten Bindung von C3 an LPS-R wurden mit gereinigtem C5 durchgeführt. Die hämolytische Aktivität von C5 wurde ebenfalls durch das LPS-R inhibiert und auch diese Hemmung ergab sich aus einer Anlagerung von C5 an das LPS-R (Experiment nicht dargestellt). Auffällig war, daß für die Bindung des C5 vollkommen andere Reaktionsparameter als für die C3-Bindung benötigt wurden. Weiterhin wurde festgestellt, daß nach vorangegangener Bindung von C5 an das LPS-R die anschließende Anlagerung von C3 kaum beeinträchtigt wurde (Abb. 39). Daraus läßt sich folgern, daß Komplementproteine auf verschiedene Weise an LPS-R gebunden werden können, wodurch eine effiziente Entfernung derselben aus dem Reaktionsmilieu möglich ist.

Zur Hemmung der Komplementaktivität und Veränderung von LPS-Eigenschaften durch die Bildung von LPS-Komplement-Komplexen

Indem LPS einzelne Komplementproteine wie C3 oder C5 aus dem Reaktionsmilieu entfernt, wird die Komplementkaskade unterbrochen. Über diesen Mechanismus kann LPS als Inhibitor von Komplement wirksam werden. Eine weitere inhibitorische Wirkung von LPS wurde in Experimenten erkennbar, in denen der Einfluß von LPS auf den alternativen Aktivierungsweg untersucht wurde. Hier zeigte sich, daß in Anwesenheit von LPS-R die C3-Konvertase $\overline{C3bBb}$ aus den Komponenten C3b, D und B nicht gebildet wurde (Abb. 56). Eine Analyse dieses Hemmeffektes wurde in der vorliegenden Arbeit nicht mehr vorgenommen. Das Experiment zeigt aber, daß funktionelle Systeme durch die Zugabe von LPS sehr wirksam gehemmt werden können. Mit diesen inhibitorischen Wirkungen auf Komplement wird eine neue Eigenschaft von LPS beschrieben. In der Literatur

wurde in vielen Arbeiten auf die Komplementaktivierung durch LPS über den klassischen oder alternativen Aktivierungsweg hingewiesen (60-68). Die daraus resultierende Aktivierung von C3 führt zu Aktivierungsprodukten, welche auf die Entzündungsreaktion, Immunantwort, Phagozytose und Zellzerstörung Einfluß nehmen (46-50, 59). Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, daß LPS aber ebensogut als Inhibitor wirksam werden kann, indem es die Bildung von biologisch aktiven Komplementaktivierungsprodukten unterdrückt (Abb. 56). Es ist vorstellbar, daß an einem lokalen Infektionsherd mit gramnegativen Bakterien sowohl die aktivierenden als auch die inhibitorischen Wirkungen von LPS zum Tragen kommen. Bei Überwiegen der inhibitorischen Wirkungen wäre eine erhebliche Beeinträchtigung der Entzündungsreaktion und der Phagozytose denkbar, welche die Vermehrung der Infektionserreger begünstigen würde. In Abbildung 59 sind die aus der Literatur bekannten aktivierenden und die in dieser Arbeit vorgestellten inhibitorischen Wirkungen von LPS auf Komplement in einer schematischen Übersicht zusammengefaßt.

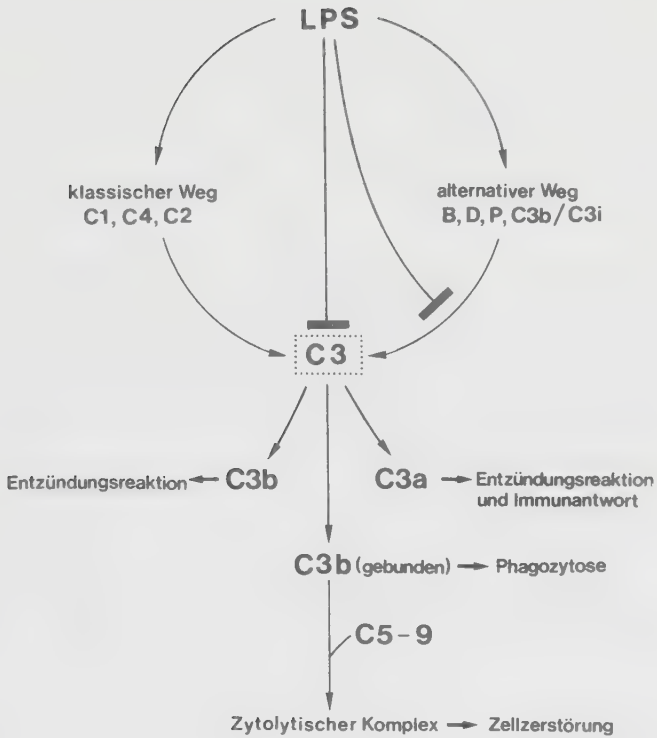


Abb. 59 Aktivierende und hemmende Wirkungen von LPS auf Komplement

Aktivierung (→)
Hemmung (—|)

Andererseits sind auch für den Makroorganismus günstige Auswirkungen als Folge der C3-Bindung an LPS vorstellbar. Es wäre z.B. zu prüfen, ob derartige LPS-Protein-Interaktionen die bekannte Toxizität von LPS reduzieren. Die Bildung von LPS-C3-Komplexen könnte auch zur schnellen Beseitigung von LPS an lokalen Infektionsherden beitragen. Hier ist vor allem an die Möglichkeit zu denken, daß an LPS gebundenes C3 enzymatisch zu C3b aktiviert wird, welches dann über C3b-Rezeptoren die Aufnahme dieser Komplexe in phagozytierende Zellen vermitteln kann. Die Trypsinbehandlung von LPS-R-C3-Komplexen führte in den eigenen Untersuchungen tatsächlich zur Bildung von Reaktionsprodukten, welche funktionell die Eigenschaft von LPS-R-C3b-Komplexen aufwiesen (Abb. 54). In einer vergleichenden Untersuchung über die Toxizität und Ingestion von LPS-C3- und LPS-C3b-Komplexen in Zellkulturen von Phagozyten könnte somit geprüft werden, in welchem Ausmaß Eigenschaften von LPS durch Beladung mit Komplementprotein verändert werden.

In wenigen orientierenden Versuchen wurde auch der Frage nachgegangen, ob intakte gramnegative Bakterien natives C3 an ihre Oberfläche binden können. Ein solcher Bindungsweg wäre von großem biologischem Nutzen für den infizierten Makroorganismus, da gebundenes C3 an der Oberfläche zu C3b aktivierbar ist, welches seinerseits phagozytosefördernd wirkt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint eine direkte C3-Bindung an Bakterien möglich. Auch dieses Arbeitsgebiet muß aber erst noch erschlossen werden, bevor klare Aussagen über die Reaktionsvorgänge möglich sind.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Die Komplementkomponenten C3 und C5 wurden durch sequentielle Anwendung von Fällungs- und Chromatographieschritten aus Meerschweinchenserum proteinchemisch gereinigt. Die Ausbeute lag auf der Basis von Aktivitätsmessungen für C3 bei 55% und für C5 bei 13%. Das Auftreten von α - und β -Ketten unter reduzierenden Bedingungen und der weitere Zerfall der α -Kette in α_1 - und α_2 -Bruchstücke unter denaturierenden Bedingungen ließ sich sowohl für C3 als auch für C5 zeigen.

In Gegenwart von Lipopolysacchariden (LPS) von verschiedenen Bakterienspezies in Glatt-(S-) und Rauh-(R-) Form (Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Serratia marcescens) wurde eine dosisabhängige vollständige Hemmung der C3- und C5-Aktivität beobachtet. In eingehenden Untersuchungen mit dem LPS-S und LPS-R von Yersinia enterocolitica ließ sich diese Hemmwirkung durch die Bildung von Komplexen aus LPS und C3 bzw. C5 erklären. Sehr große Komplexe kamen vor allem durch die Reaktion von LPS-R mit C3 zustande. Die Bedeutung des physikalischen Zustandes für das Reaktionsvermögen mit C3 wurde besonders beim LPS-S deutlich, welches erst nach Lösung mit Triethylamin in die reaktionsfähige Form überging.

Die Bindung von C3 an LPS und die Abnahme der C3-Aktivität zeigten einen parallelen Verlauf. Für 200 μg LPS-R konnte ein Sättigungswert von etwa 25 μg C3 festgestellt werden. Als Bindungsort wurde die Lipoid A-Region identifiziert. Die Anlagerung von C3 an LPS-R erfolgte über einen hydrophoben Bindungsmechanismus. Die Wirksamkeit dieser Bindung war an hämolytisch aktives, natives C3 gebunden, da für C3b, ein durch Trypsinspaltung gewonnenes Fragment von C3, ein stark reduziertes Bindungsvermögen gefunden wurde.

Nach vorausgegangener Bindung von C5 an LPS-R war die anschließende Anlagerung von C3 kaum beeinträchtigt. Daraus folgt, daß verschiedene bindungsfähige Proteine über unterschiedliche Mechanismen angelagert werden können.

LPS-R-C3-Komplexe waren unter Trypsineinwirkung aktivierbar zu LPS-R-C3b-Komplexen. An LPS-R gebundenes C3b zeigte aber nur ein geringes Reaktionsvermögen mit den Faktoren D und B. Auch die Reaktion von löslichem C3b mit den Faktoren D und B war durch die Gegenwart von LPS hemmbar. Der Reaktionsmechanismus, welcher der Hemmwirkung von LPS auf die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges zugrunde liegt, konnte noch nicht geklärt werden.

LPS erwies sich in den Versuchen der vorliegenden Arbeit als ein sehr wirksamer Inhibitor von Komplementeinzelfaktoren (C3, C5) und auch von reaktionsfähigen Komponentengemischen (C3b, D, B). Diese inhibitorische Wirkung könnte bei einem lokalen Infektionsgeschehen mit gramnegativen Bakterien durch Hemmung von Komplement-vermittelten Abwehr- und Entzündungsreaktionen pathogenetische Bedeutung haben.

V. MATERIAL UND METHODEN

1. Lipopolysaccharid-(LPS)Präparationen

1.1. Herkunft des LPS

Das LPS von Escherichia coli (E. coli), Salmonella typhimurium (S. typh.), Yersinia pseudotuberculosis (Y. ps.) und Serratia marcescens (S. mar.) stammte von Wildstämmen, welche in den diagnostischen Laboratorien aus Untersuchungsmaterial isoliert worden waren. Bei diesen Stämmen handelt es sich um Glattformen (Dr. K. Wartenberg; pers. Mitteilung). Die verschiedenen Bakterienstämme der Spezies Yersinia enterocolitica (Ye 75 S, Ye 75 R, Ye 161 S, Ye 161 R, Ye 161 Re) entstammten der Sammlung des Instituts und wurden von Herrn Prof. Dr. Knapp zur Verfügung gestellt. Die Bakterienkulturen für die LPS-Extraktionen wurden aus exponentiell wachsenden Subkulturen in Tryptic Soy Broth (TSB) auf TSB-Agar angezüchtet. Die Bebrütung erfolgte in der Regel für 24-48 Stunden bei 22°C (Glattstämmen) oder bei 35°C (Rauhstämmen). Alle Anzüchtungen wurden nach Beendigung des Wachstums auf ihr Vorliegen in R- oder S-Form überprüft. Rauhmутanten (Ye 75 R, Ye 161 R und Ye 161 Re) zeigten in 3,5%igem NaCl, in einer 0,3%igen Auraminlösung und in der Kochprobe das für Rauhformen typische Agglutinations- bzw. Flockungsverhalten.

1.2. Extraktion, chemische Analyse und Lösung des LPS

Die Bakterienkulturen wurden mit Phenol-Leitungswasser (1%) von den Petrischalen abgeschwemmt. Dann wurden die Bakterien mit 96% Äthanol aus der Suspension ausgefällt (1 Teil Bakteriensuspension + 5 Teile Äthanol) und abzentrifugiert. Nach Entwässerung mit Aceton und Äther wurden die Sedimente in einem Exsikkator über H_2SO_4 getrocknet. Die Extraktion der getrockneten Bakterien erfolgte mit Phenol/Wasser (55) oder mit Phenol/Chloroform/Petroläther (56). Das Roh-LPS wurde

durch Ultrazentrifugation weiter gereinigt ($3 \times 100000 \times g$) und anschließend lyophilisiert. Die Zuckerzusammensetzung des gereinigten LPS wurde nach Hydrolyse mit verdünnter H_2SO_4 und Reduktion sowie Acetylierung der Hydrolysate gaschromatographisch bestimmt (102, 103). Diese Bestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K. Wartenberg durchgeführt. Die qualitative Zuckerzusammensetzung für die in dieser Arbeit verwendeten LPS der Bakterienstämme von Yersinia enterocolitica zeigt Tab. 19.

Vor Anwendung in den verschiedenen Experimenten wurden die gereinigten, lyophilisierten LPS-Präparationen in H_2O bidest. aufgenommen (2 mg/ml) und in der Regel mit 10 mM Triethylamin versetzt. In einem Ultraschallbad (Bransonic 52) wurden diese LPS-Präparationen für 2 min beschallt und anschließend solange gegen H_2O bidest. dialysiert, bis das Dialysat keine alkalische Reaktion mehr zeigte. Die Aufbewahrung des derart gelösten LPS erfolgte bei $-70^\circ C$ oder für maximal 8 Tage bei $4^\circ C$.

1.3. Gewinnung von LPS-OH und von Lipoid A durch Hydrolyse des LPS

LPS (10 mg) wurde in 1 ml H_2O bidest. unter Erhitzen gelöst. Durch Zugabe von NaOH (4 N) wurde die Probe auf eine Endkonzentration von 0,2 N NaOH eingestellt und 1 h bei $100^\circ C$ erhitzt. Anschließend wurde gegen H_2O bidest. dialysiert, bis das Dialysat keine alkalische Reaktion mehr zeigte. Das LPS-OH (Retentat) wurde lyophilisiert (104). Die Ausbeute in Bezug auf die eingesetzte Menge LPS lag zwischen 55 und 63%. Für die Gewinnung von Lipoid A-OH wurde LPS-OH (6 mg) in 1 ml H_2O bidest. unter Erhitzen gelöst. Nach dem Ansäuern mit 4 N HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,04 N erfolgte die Hydrolyse bei $100^\circ C$ für 30 min. In Eiswasser wurde die Probe auf $0^\circ C$ abgekühlt und das Präzipitat wurde abzentrifugiert. Nach dreimaligen Waschen in 0,04 N HCl wurde das

Tab. 19 Qualitative Zusammensetzung des LPS der verschiedenen Bakterienstämme von *Yersinia enterocolitica*³(103)

Stamm	GalN	GlcN	KDO	HepI	HepII	Glc	Gal	Man	Fuc	Rha	Abe	6-Desoxy- hexose ¹	6-Desoxy- hexose ²
Ye 75 S	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
Ye 75 R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ye 161 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Ye 161 R	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ye 161 Re	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ 6-Desoxy-2-altrose (WARTENBERG; pers. Mitteilung)

² 6-Desoxyglucose (WARTENBERG; pers. Mitteilung)

³ Die qualitativen Zuckeranalysen wurden von Dr. K. Wartenberg zur Verfügung gestellt.

Abkürzungen: Galactosamin (GalN); Glucosamin (GlcN); 2-Keto-3-desoxyoctonat (KDO);

L-Glycero-D-mannoheptose (HepI); D-Glycero-D-mannoheptose (HepII);

Glucose (Glc); Galactose (Gal); Mannose (Man); Fucose (Fuc); Rhamnose (Rha);

Abequose (Abe).

Lipoid A-OH lyophilisiert (10^4). Die Ausbeute für die verschiedenen Präparationen lag zwischen 25 und 35%. Für die Versuche wurden diese Präparationen analog dem für LPS beschriebenen Verfahren gelöst.

2. Aktivitätsbestimmung von C3 und C5 im hämolytischen Testsystem

Es wurden Reaktionsansätze angefertigt, die eine definierte Menge sensibilisierter Erythrozyten (EA), sowie alle Komponenten der klassischen Komplementkaskade (C1-C9) mit Ausnahme von C3 oder C5 enthielten. Diesen Ansätzen wurde die zu untersuchende Probe zugesetzt. Das Auftreten von Hämolyse zeigte C3- oder C5-Aktivität in der Probe an. Aus dem Grad der Hämolyse ließ sich die in der Probe befindliche Menge an C3 oder C5 berechnen. Die eingesetzten Reagenzien und der Testablauf sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.1. Testreagenzien

2.1.1. Pufferlösungen (10^5)

a) Alsever-Lösung

Dextrose	20,5 g
Na-citrat x 2 H ₂ O	7,92 g
NaCl	4,2 g
Citronensäure	0,55 g
H ₂ O dest.	ad 1000,0 ml
pH 6,1	
steril filtriert	

b) VBS-Stammlösung

NaCl	88,5	g
Na-5,5 diäthylbarbiturat	10,19	g
HCl (1 N)	34,58	ml
H ₂ O dest.	ad 2000,0	ml
pH 7,35 (bei Messung 1:5 verdünnen)		

c) Sucrose-Stammlösung

Sucrose	972,2	g
Na-5,5 diäthylbarbiturat	10,19	g
HCl (1 N) ad pH 7,35		
H ₂ O dest.	ad 2000,0	ml

d) EDTA-Stammlösung 0,1 M

Na ₂ H ₂ -EDTA	57,2	g
NaOH (2 N) ad pH 7,65		
H ₂ O dest.	ad 1000,0	ml

e) VBS⁺⁺

VBS-Stammlösung	400	ml
CaCl ₂ (0,3 M)	1	ml
MgCl ₂ (2,0 M)	1	ml
Gelatine	2	g
H ₂ O dest.	ad 2000	ml
pH 7,3 - 7,4		

f) VBS⁺⁺-S

Sucrose-Stammlösung	240	ml
VBS-Stammlösung	160	ml
CaCl ₂ (0,3 M)	1	ml
MgCl ₂ (2,0 M)	1	ml
Gelatine	2	g
H ₂ O dest.	ad 2000	ml
pH 7,3 - 7,4		

g) VBS⁺⁺/2

VBS-Stammlösung	200	ml
CaCl ₂ (0,3 M)	1	ml
MgCl ₂ (2,0 M)	1	ml
Glucose	50	g
Gelatine	2	g
H ₂ O dest.	ad 2000	ml
pH 7,3 - 7,4		

h) VBS-EDTA

VBS-Stammlösung	320	ml
EDTA (0,2 M)	200	ml
Gelatine	2	g
H ₂ O dest.	ad 2000	ml
pH 7,5		

2.1.2. Herstellung von sensibilisierten Hammelerythrozyten (EA)

Hammelblut (ca. 150 ml) wurde aseptisch in einem gleichen Volumen steriler Alsever-Lösung unter ständigem Rühren aufgefangen. Vor ihrer weiteren Verwendung mußten die Erythrozyten mindestens 7 Tage bei 4°C gelagert werden. Eine geeignete Menge Hammelblut (35 ml) wurde aus der Blut-Alsever-Lösung entnommen und bei 1000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall Superspeed RC 5). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Leukozytenschicht wurde mit einer Pipette vom Sediment entfernt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in je 100 ml VBS-EDTA gewaschen und mittels einer Hämoglobin-Eichkurve auf 10^9 Zellen/ml eingestellt (Gilford, Photometer Modell 250; 412 nm).

Ein bestimmtes Volumen dieser Erythrozytensuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit vorverdünntem Ambozeptor (1:200 in VBS-EDTA; Ambozeptor 6000, Behringwerke Marburg) unter ständigem Rühren zusammengegeben und anschließend bei 37°C für 20 min

inkubiert. Die EA-Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal in VBS⁺⁺ und zweimal in VBS⁺⁺-S gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension mittels einer Hämoglobin-Eichkurve auf 5×10^8 EA/ml eingestellt (105). Diese sensibilisierten Zellen wurden bei 4°C gelagert und fanden bis maximal 14 Tage nach ihrer Präparation Anwendung in der Komplement-Titration.

2.1.3. Herstellung von EAC142-Zellen

Ein bestimmtes Volumen der EA-Zellen wurde abzentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 x g) und einmal mit VBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf 5×10^8 EA/ml eingestellt und mit vorverdünntem R3-Reagenz als Quelle von C1, C4 und C2 im Verhältnis 1:1 für 10 min bei 37°C inkubiert (R₃-Verdünnung 1:45 bis 1:60). Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und zweimal in VBS⁺⁺ gewaschen (85). Dann wurde die Zellzahl auf $0,65 \times 10^8$ EAC142/ml eingestellt. Diese EAC142-Zellen fanden bis maximal 6 Stunden nach ihrer Herstellung Anwendung im Test.

2.1.4. Herstellung von EAC4-Zellen

Ein bestimmtes Volumen der EA-Zellen wurde abzentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 x g) und einmal mit VBS⁺⁺ gewaschen. Die Zellzahl wurde auf 5×10^8 EA/ml eingestellt. Danach wurde unter Kühlung und Rühren gereinigtes C1 zugegeben (400 effektive Moleküle C1 pro Erythrozyt). Diese Mischung aus EA und C1 wurde für 15 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Das Volumen aus x ml EA und x ml C1 wurde mit dem Faktor 2,5 zur Berechnung eines theoretischen Endvolumens multipliziert. Durch Zugabe von Meerschweinchenserum (1/10 des theoretischen Endvolumens) und von VBS-EDTA wurde dann bis zu dem berechneten Endvolumen aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde wiederum für 15 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 4°C, 3000 UpM) und dreimal in VBS-EDTA gewaschen. Nach einer Inkubation von

15 min bei 37°C wurden die Zellen erneut zweimal mit VBS-EDTA und zweimal in VBS⁺⁺ gewaschen und auf $1,3 \times 10^8$ EAC⁴/ml eingestellt (105). Die Haltbarkeit der EAC⁴-Zellen betrug in der Regel 14 Tage.

2.1.5. Herstellung von EAC⁴-Zellen

Ein bestimmtes Volumen der EAC⁴-Zellen wurde im Verhältnis 1:1 mit einer C1-Verdünnung (200 effektive Moleküle pro Erythrozyt in VBS⁺⁺) für 15 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 x g), zweimal in VBS⁺⁺-S gewaschen und auf $1,3 \times 10^8$ Zellen/ml eingestellt (105). Die Haltbarkeit dieser Zellen lag bei maximal 6 Stunden.

2.1.6. Präparation von R₃-Reagenz

Zur Inaktivierung von C3 wurde Meerschweinchenserum mit Cobratoxin versetzt (5 mg/ml) und für 60 min bei 37°C, anschließend für weitere 60 min bei Zimmertemperatur inkubiert (85). Dieses Reagenz wurde in 0,3 ml Portionen aufgeteilt und bei -70°C tiefgefroren. In R₃ war gute Aktivität von C1, C4 und C2 enthalten.

2.1.7. Präparation von R₄-Reagenz

Meerschweinchenserum wurde mit einer 0,16 M Hydrazinlösung (0,25 ml Hydrazinlösung/ml Serum) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,15 M HCl auf 7,2 eingestellt (85). Das Reagenz wurde zu 0,3 ml Portionen aufgeteilt und bei -70°C tiefgefroren. In R₄ war gute Aktivität von C5, C6, C7, C8 und C9 enthalten.

2.2. Testsystem für C3

Alle Aktivitätsbestimmungen wurden in Eppendorff-Reagiergefäßen (V=1,5 ml) nach folgendem Pipettierschema durchgeführt.

Testansatz: 0,2 ml $\overline{\text{EAC142}}$ ($0,65 \times 10^8$ Zellen/ml)
0,1 ml Probe mit C3
1,0 ml R_4 (1:1500 in $\text{VBS}^{++}/2$) als Quelle von
C5 bis C9

In Kontrollansätzen wurde die spontane Lyse der $\overline{\text{EAC142}}$ -Zellen durch Inkubation in Puffer (Kontrollansatz 1) oder in dem R_4 -Reagenz (Kontrollansatz 2) bestimmt. Der maximale Lysewert wurde durch Aufnahme der Zellen in H_2O dest. erreicht (Kontrollansatz 3). Alle Ansätze wurden bei 4°C gemischt und danach bei 37°C für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Reagiergefäße für 2 min in Eppendorff Tischzentrifugen (Modell 5412) zentrifugiert und die Extinktion der Überstände wurde bei 412 nm (Gilford Photometer, Modell 250) gemessen (70). Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der täglich frisch hergestellten $\overline{\text{EAC142}}$ -Zellen wurde stets in jedem Versuch eine Eichkurve aus Meerschweinchenserum-Verdünnungen erstellt.

2.3. Testsystem für C5

Sämtliche Aktivitätsbestimmungen wurden in Eppendorff-Reagiergefäßen (V=1,5 ml) durchgeführt. Die für diesen Test erforderlichen Komplementkomponenten C2, C3, C6, C7, C8 und C9 wurden von der Firma Dr. Madaus Diagnostika, Köln, bezogen. Die eingesetzten Aktivitätsmengen sind im Testansatz in Einheiten (E) angegeben. In entsprechenden Kontrollansätzen wurde die spontane Lyse der $\overline{\text{EAC14}}$ -Zellen in Puffer (Kontrollansatz 1), sowie in Gegenwart von allen Komponenten außer C5 (Kontrollansatz 2) bestimmt. Der maximale Lysewert (Kontrollansatz 3) wurde durch Inkubation der Zellen mit H_2O dest.

ermittelt. Nach Beendigung der Inkubationsphase wurden die Reagiergefäße zentrifugiert und die Extinktion der Überstände wurde bei 412 nm gemessen. Die Empfindlichkeit der Zellen wurde in jedem Versuch mit Meerschweinchenserum-Verdünnungen überprüft.

Testansatz: 0,1 ml EAC14

0,1 ml C2 (100 E)

0,1 ml C3, C6, C7 (100, 125, 125 E)

0,1 ml Probe mit C5

Inkubation
30 min 30°C

0,1 ml C8, C9 (100, 100 E)

Inkubation
60 min 37°C

0,8 ml VBS⁺⁺/2

2.4. Quantitative Aktivitätsbestimmung von C3 und C5 (Z-Wert und effektive Moleküle)

Aus den Extinktionswerten (OD 412 nm) der Reaktionsansätze wurde zunächst der jeweilige Grad (y) der Hämolyse bestimmt.

$$y = \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Kontrollansatz 1}}}{OD_{\text{Kontrollansatz 3}} - OD_{\text{Kontrollansatz 2}}}$$

Nach der von MAYER (106) aufgestellten "one hit-Theorie" für die Immnhämolyse wurde dann die Zahl der hämolytisch aktiven Moleküle pro Erythrozyt im Reaktionsansatz durch die Berechnung des "Z-Wertes" ermittelt.

$$Z = - \ln (1 - y)$$

Um die Gesamtzahl der in einer Probe von 1 ml enthaltenen effektiven Moleküle einer bestimmten Komplementkomponente zu erhalten, wurden der Z-Wert, der reziproke Wert der Probenverdünnung und die eingesetzte Menge an Erythrozyten pro ml miteinander multipliziert.

3. Aktivitätsbestimmung von B, D und C3bBb

Die Inkubation eines Reaktionsgemisches aus C3b, B, D und C3 führt zur Inaktivierung von C3. Wenn B oder D durch eine Probe ersetzt werden, läßt sich bestimmen, ob diese Probe die Komponenten B oder D enthält. Dieser Test läßt sich auch in zwei Schritten durchführen, wobei in der ersten Inkubationsphase durch Reaktion von C3b, B und D das C3bBb-Enzym entsteht, welches in der zweiten Phase C3 inaktiviert. Mit dieser Modifikation ist eine quantitative Aussage über die Bildung des C3bBb-Enzyms möglich.

3.1. Testsystem für B

Alle Bestimmungen wurden in Eppendorff-Reagiergefäßen (V=1,5 ml) durchgeführt.

Testansatz: 0,1 ml C3b (50 µg/ml)
 0,1 ml D (≈ 10 Einheiten)
 0,1 ml VBS⁺⁺/2
 0,1 ml C3 (20 µg/ml)
 0,1 ml Probe mit B in verschiedenen Verdünnungen

Nach einer Inkubationsphase von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 0,1 M EDTA, pH 7,5, abgestoppt. Proben von 0,1 ml wurden aus den Reaktionsansätzen entnommen und die verbliebene C3-Aktivität wurde im C3-Test bestimmt. Über einen Kontrollansatz, der alle Komponenten außer B enthielt, wurde unter identischen Versuchsbedingungen die maximal eingesetzte C3-Aktivität ermittelt. Im Vergleich zu dieser Kontrolle wurde der prozentuale C3-Umsatz in den Reaktionsansätzen mit Faktor B berechnet. Aus der graphischen Auftragung des C3-Umsatzes gegen die eingesetzten Probenverdünnungen ließ sich diejenige Verdünnung bestimmen, bei der 50%iger C3-Umsatz vorlag. Die auf diesem Wege bestimmte Menge an B entsprach einer Einheit (E). Der Titer der

B-Präparation ergab sich aus dem reziproken Wert von der Verdünnung, bei der 50%iger C3-Umsatz vorlag.

3.2. Testsystem für D

Testansatz: 0,1 ml C3b (50 µg/ml)
0,1 ml B ($\hat{=}$ 5 Einheiten)
0,1 ml VBS⁺⁺/2
0,1 ml C3 (20 µg/ml)
0,1 ml Probe mit D in verschiedenen Verdünnungen

Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 20 µl 0,1 M EDTA, pH 7,3, abgestoppt. Der Kontrollansatz, in dem die maximale C3-Aktivität bestimmt wurde, enthielt alle Testkomponenten mit Ausnahme von D. Die Auswertung und Quantifizierung der D-Aktivität erfolgte entsprechend den Angaben wie sie für den B-Test gemacht worden sind.

3.3. Testsystem für C3bBb

In diesem Test wurde die Aktivität des Enzyms C3bBb an Hand der enzymabhängigen C3-Inaktivierung gemessen.

Testansatz: 0,1 ml C3b (10-20 µg/ml)
0,1 ml B ($\hat{=}$ 5 Einheiten)
0,1 ml D ($\hat{=}$ 10 Einheiten)
0,1 ml VBS⁺⁺/2

Inkubation bei 20°C für 0-60 min

0,02ml EDTA (0,1 M; pH 7,3)
0,1 ml C3 (20 µg/ml)

Inkubation bei 30°C für 30 min

In den Reaktionsansätzen wurde mit den Komponenten C3b, B und D zunächst der Enzymkomplex C3bBb gebildet. Durch Zugabe von

EDTA konnte die pro Zeiteinheit gebildete Menge des Mg^{++} -abhängigen Enzyms fixiert und anschließend mit hämolytisch aktivem C3 zur Reaktion gebracht werden. Die in den Reaktionsansätzen verbliebene C3-Aktivität wurde im C3-Test bestimmt. Mit Hilfe eines Kontrollansatzes, der kein B enthielt, wurde in jedem Test die maximal eingesetzte C3-Aktivität ermittelt. Im Vergleich zu dieser Kontrolle konnte der prozentuale C3-Umsatz oder die prozentuale C3-Restaktivität in den enzymhaltigen Reaktionsgemischen berechnet werden.

4. Reinigung von C3 und C5 aus Meerschweinchen Serum

4.1. Gewinnung des Serums

Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet und durch einen Halsschnitt ausgeblutet. Das aufgefangene Blut wurde für 20 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann für weitere 3-4 Stunden bis zur vollständigen Gerinnung bei 4°C gelagert. Durch Zentrifugation (10 min, 4000 UpM, RC5 Superspeed Sorvall) wurde das Serum von den Bestandteilen abgetrennt und anschließend bei -70°C gelagert.

4.2. Gemeinsame Reinigungsschritte für C3 und C5

4.2.1. Proteinfällung mit Polyethylenglycol (PEG) 4000

Die Proteine von 150 ml Serum wurden bei 4°C durch tropfenweises Zusetzen einer 25%igen PEG-Stammlösung (PEG gelöst in 100 mM KPO_4 /150 mM NaCl/5 mM EDTA/0,5 mM PMSF; pH 7,4) ausgefällt. Der Reaktionsansatz wurde von Beginn an bis 30 min nach Zugabe des PEG ständig gerührt. Bei einer Endkonzentration von 5% PEG ($\hat{=}$ 37,5 ml Stammlösung) wurde der Niederschlag 30 min bei 10000 UpM abzentrifugiert (RC5 Superspeed Sorvall). Die vereinigten Überstände (185 ml) wurden erneut mit PEG bis zu einer Endkonzentration von 12% ($\hat{=}$ 97,5 ml Stammlösung) versetzt und die ausgefällten Proteine wurden

abzentrifugiert. Die Sedimente beider Fällungsschritte (5% und 12%) wurden in 400 ml KPO_4 -Puffer (100 mM KPO_4 /150 mM NaCl/ 5 mM EDTA; pH 7,4) aufgenommen (71).

4.2.2. Lysin-Sepharose 4 B - Chromatographie

Die resuspendierten Sedimente der PEG-Fällung wurden auf eine Chromatographiesäule (1,6 x 13,5 cm; Bettvolumen 27 ml) gegeben, die mit äquilibrierter Lysin-Sepharose 4 B gefüllt worden war (Durchflußrate: 20 ml/h; Fraktionsvolumen: 16 ml). Die Säule wurde solange mit Äquilibrierungspuffer (100 mM KPO_4 /150 mM NaCl/5 mM EDTA/0,5 mM PMSF; pH 7,4) gewaschen, bis das Eluat nahezu proteinfrei war (Durchflußphotometer Uvicord S; Fraktionssammler Ultrorac II; LKB, Brommer, Schweden). Durch Erhöhung der Salzkonzentration in dem Äquilibrierungspuffer auf 0,5 M wurde unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen. Die Abtrennung des gebundenen Plasminogen erfolgte mit 0,2 M EACA in H_2O bidest.. Anschließend wurde die Säule mit einem Phosphatpuffer (100 mM KPO_4 /200 mM EACA/ 1 M NaCl; pH 7,4) gereinigt und mit dem Äquilibrierungspuffer (s.o.) regeneriert (71, 72). Alle Fraktionen mit C3- und C5-Aktivität wurden vereinigt (430 ml) und in einem Dialysierschlauch gegen den Äquilibrierungspuffer der DEAE-Sephacel Säule dialysiert (48 Stunden; 4 x 2000 ml).

4.2.3. DEAE-Sephacel-Ionenaustauscherchromatographie

Die dialysierte Proteinlösung wurde auf eine DEAE-Sephacel Säule (4,5 x 3,5 cm; Bettvolumen: 470 ml) aufgetragen, die gegen einen KPO_4 -Puffer (25 mM KPO_4 /30 mM EACA/5 mM EDTA; pH 7,0) äquilibriert worden war (89). Unspezifisch adsorbiertes Protein wurde mit dem Äquilibrierungspuffer (2000 ml) von der Säule gewaschen. Das an den Ionenaustauscher gebundene Protein wurde unter den gleichen Pufferbedingungen mit einem linearen NaCl-Gradienten (2 x 2000 ml;

0-300 mM NaCl $\hat{=}$ 2,1 - 16 mS; 4°C) eluiert (Durchflußrate: 20 ml/h; Fraktionsvolumen: 18 ml). Die Ausbildung des Gradienten wurde durch Ionenleitfähigkeitsmessungen (Leitfähigkeitsmesser Typ CDM 2f, Zellkonstante: 0,72 cm, Firma Hillerkus) in den einzelnen Fraktionen verfolgt. Alle Messungen wurden bei 4°C vorgenommen. Die Fraktionen mit C5-Aktivität wurden vereinigt, konzentriert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Die Fraktionen mit C3-Aktivität wurden nach Vereinigung sofort gegen den Äquilibrierungspuffer der SP-Sephadex C 50 Säule dialysiert (24 h, 3 x 2000 3 x 2000 ml).

4.3. Weitere Reinigung von C3

4.3.1. Ionenaustauscherchromatographie mit SP-Sephadex C 50

Die SP-Sephadex C 50 - Säule (4,0 x 35 cm; Bettvolumen: 300 ml) war gegen einen Phosphatpuffer (10 mM $\text{KPO}_4/5$ mM EDTA/5 mM EACA; pH 6,0) äquilibriert worden. Die dialysierte Proteinlösung von der DEAE-Sephacel-Säule wurde aufgetragen. Die Säule wurde solange mit dem Äquilibrierungspuffer nachgewaschen, bis das Eluat nahezu proteinfrei war (Durchflußphotometer Uvicord S). Die Elution des adsorbierten Proteins erfolgte unter den gleichen Pufferbedingungen mit einem linearen NaCl-Gradienten (2 x 1000 ml; 0-300 mM NaCl $\hat{=}$ 1,8 - 16 mS, 4°C). Fraktionen mit einem Volumen von 18 ml wurden gesammelt; die Durchflußrate betrug 20 ml/h. Nur Fraktionen mit hoher C3-Aktivität wurden vereinigt, mit 0,1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und konzentriert.

4.3.2. Gelfiltration mit Sephacryl S 300

Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine Chromatographiesäule (2,6 x 100 cm; Bettvolumen: 480 ml) aufgetragen. Die Gelfiltration erfolgte in einem KPO_4 -Puffer (25 mM $\text{KPO}_4/10$ mM EACA/5 mM EDTA; pH 7,5). Fraktionen mit einem Volumen

von 1,5 ml wurden gesammelt; die Durchflußrate war 10 ml/h. Nur Fraktionen mit hoher C3-Aktivität wurden vereinigt und konzentriert.

4.4. Weitere Reinigung von C5

4.4.1. Gelfiltration mit Sephacryl S 300

Die Reinigung der konzentrierten Proteinlösung mit C5-Aktivität wurde zunächst mit einer Gelfiltration fortgesetzt. Das Gelmaterial war gegen KPO_4 -Puffer (10 mM KPO_4 /150 mM NaCl; pH 7,0) äquilibriert. Die Filtration erfolgte mit einer Durchflußrate von 10 ml/h, wobei Fraktionen mit einem Volumen von 2,5 ml gesammelt wurden. Nur die Fraktionen mit C5-Aktivität wurden vereinigt.

4.4.2. Chromatographie mit Hydroxylapatit

Die Proteinlösung von der S 300 Säule mit C5-Aktivität wurde nach Dialyse (24 h; 3 x 1000 ml) gegen einen 25 mM KPO_4 -Puffer, pH 6,8, auf die Hydroxylapatit-Säule (46 x 20 cm; Bettvolumen: 80 ml) aufgetragen. Nachdem nicht adsorbiertes Protein mit dem obigen Puffer (500 ml) von der Säule gewaschen worden war, wurde mit einem linearen Phosphat-Gradienten (2 x 750 ml; 25-500 mM KPO_4 ; pH 6,8 $\hat{=}$ 2,6 - 48 mS; 4°C) eluiert. Die Durchflußrate war 10 ml/h und das Fraktionsvolumen 2,5 ml. Nur Fraktionen mit hoher C5-Aktivität wurden vereinigt und gegen den Äquilibrierungspuffer der QAE-Sephadex-Säule dialysiert (24 h, 3 x 1000 ml).

4.4.3. Ionenaustauscherchromatographie mit QAE-Sephadex A 50

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung auf die QAE-Säule (2,6 x 25 cm; Bettvolumen: 110 ml), die gegen einen 50 mM KPO_4 -Puffer, pH 7,0, äquilibriert worden war, aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 1000 ml

Äquilibrierungspuffer nachgewaschen. Die Elution des adsorbierten Proteins erfolgte unter gleichbleibenden Pufferbedingungen mit einem linearen NaCl-Gradienten (2 x 750 ml; 0-300 mM NaCl $\hat{=}$ 2,2 - 17 mS; 4°C). Bei einer Durchflußrate von 10 ml/h wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2,5 ml gesammelt. Die Fraktionen mit hoher C5-Aktivität wurden vereinigt.

5. Reinigung von B und D aus Meerschweinchen Serum

5.1. Präparation von funktionell gereinigten B und D

Zur Isolierung von B und D wurde der Überstand einer 12%igen (w/v) PEG-Fällung von 150 ml Meerschweinchen Serum bis zu einer Endkonzentration von 22% (w/v) mit PEG versetzt. Das Präzipitat mit den Proteinen B und D wurde in 200 ml KPO_4 -Puffer (5 mM KPO_4 /5 mM EDTA/25 mM EACA/0,5 mM PMSF; pH 6,5) resuspendiert und auf eine DEAE-Sephacel-Säule (3,5 x 35 cm; Bettvolumen: 240 ml), die mit dem oben genannten Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen (107). Beide Proteine wurden nicht an das Austauschermaterial gebunden, eluierten aber nach dem Waschen der Säule mit dem Äquilibrierungspuffer in voneinander getrennten Aktivitätsbereichen. Nach Vereinigung der jeweiligen Fraktionen mit B- oder D-Aktivität und anschließender Konzentrierung der Proteinlösungen konnten die beiden Präparate als funktionell gereinigte Reagenzien verwendet werden. Die B-Präparationen wiesen einen Titer zwischen 300 bis 400 auf. Die ermittelten Titer für die D-Präparationen lagen bei einer Million.

5.2. Präparation von hochgereinigtem B

Zur Herstellung von hochgereinigtem B wurde eine Rechromatographie des funktionell gereinigten B über eine DEAE-Sephacel-Säule (4 x 30 cm; Bettvolumen: 180 ml, äquilibriert gegen 5 mM Tris HCl/5 mM EDTA/50 mM EACA; pH 8,0) durchgeführt.

Die vereinigten Fraktionen mit B-Aktivität wurden konzentriert (UF-Zelle, Membran PM 30, Firma Amicon) und mit Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC-Pumpe 2150, Fraktions-sammler 2211, HPLC-Säule TSK 3000, Firma LKB) weiter gereinigt. Die Präparate, die nach elektrophoretischer Analyse frei von Fremdprotein waren, wiesen dann in der Regel eine Konzen-tration von 0,5 mg Protein/ml auf.

6. Präparation von C3b

C3b wurde durch Trypsinspaltung von hämolytisch aktivem, gereinigtem C3 gewonnen (108). C3 wurde in einer Konzen-tration von 1 mg/ml in 25 mM KPO_4 -Puffer, pH 7,5, im Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:10 für 2 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von Trypsininhibitor (Trypsininhibitor:Trypsin $\hat{=}$ 3:1). Das Reaktionsgemisch wurde nach Ankonzentration in Kollodium-hülsen (Firma Sartorius, Göttingen) über eine Sephacryl S 300 Säule (1,6 x 100 cm, Bettvolumen: 160 ml) filtriert. Die C3b enthaltenen Fraktionen wurden nach Proteinschreibung (OD 280 nm, Uvicord S) vereinigt und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

7. Behandlung von C3 mit Hydroxylamin

Die hämolytische Aktivität von C3 wird durch die kovalente Bindung von Hydroxylamin an den Thioester des C3-Moleküles aufgehoben (27). C3 (1 mg/ml in 0,1 M NaPO_4 -Puffer, pH 7,5) wurde in Gegenwart von 50 mM Hydroxylamin (1 M in 0,1 M NaPO_4 -Puffer, pH 7,5) für 5 Stunden bei 25°C inkubiert. Zur Entfernung des nicht gebundenen Hydroxylamin wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei 4°C gegen VBS⁻⁻⁻-Puffer dia-lysiert. Im C3-Test ließ sich für C3-NH₂OH keine hämolytische Aktivität mehr nachweisen. Zur Herstellung von radioaktiv markierten ¹⁴C-C3-NH₂OH wurde, ausgehend von hämolytisch aktivem ¹⁴C-C3, in dergleichen Weise vorgegangen.

8. Proteinbestimmung

Zur Fällung der Proteine wurden die Lösungen mit 0,1 ml 3 M Trichloressigsäure versetzt und mit einer Laborzentrifuge (Minifuge 2, Firma Heraeus Christ, Osterode/Harz) für 15 min bei 4000 UpM abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden in 0,5 ml H₂O bidest. aufgenommen und nach Zugabe von 5 ml Reagenz I für 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden 0,5 ml verdünntes Reagenz II hinzugegeben. Nach Mischung und weiterer Inkubation für 30 min wurde die Extinktion gegen einen Leerwert bei 660 nm bestimmt. Der Proteingehalt wurde an Hand einer Eichkurve mit BSA als Proteinstandard (20-200 µg) ermittelt (109).

Reagenz I : 100 ml 3% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH
 1 ml 2% K-Na-Tartrat
 1 ml 1% CuSO₄ x 5 H₂O

Das Reagenz I wurde kurz vor der Bestimmung aus Stammlösungen hergestellt.

Reagenz II: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz
 (Firma Merck, Art. Nr. 9001)
 1:3 verdünnt eingesetzt

9. Konzentrieren von Proteinlösungen

Die Konzentrierungsschritte wurden mit den Ultrafiltrationszellen und Membranen der Firma Amicon (Oosterhout, Holland) durchgeführt. Als Filtrationskammern wurden die UF-Zelle 12 (bis 10 ml), UF-Zelle 52 (bis 65 ml) und die UF-Zelle 402 (bis 400 ml) eingesetzt. Als Ultrafiltrationsmembranen wurden ausschließlich Membranen der PM- und XM-Serien mit Durchlaßgrenzen von 10 KD bis 100 KD verwendet. Die Filtrationen wurden mit Stickstoffdruck bei 4°C unter Beachtung des vom Membrantyp abhängigen optimalen Druckes durchgeführt. Für einige Experimente wurden die Ankonzentrationen im

Anschluß an eine Dialyse in Kollodiumhülsen vom Typ SM 13200 (Firma Sartorius, Göttingen) vorgenommen.

10. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

10.1. SDS-PAGE

Die Analyse von Proteinproben in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) erfolgte mit der vertikalen Plattenelektrophorese (Gel Electrophoresis Cell, Modell 220, Firma Bio Rad; Stromkonstantgerät Modell 2103, Firma LKB). Es wurden 0,15 cm starke Gele gegossen, wobei über ein Trenngel von 18 ml Volumen ein großporiges Sammelgel von 7,5 ml Volumen polymerisiert wurde. Die Ausbildung von Geldaschen im Sammelgel, die eine Auftragsmenge von je 5-100 µl Proteinklösung gestatteten, erfolgte während der Polymerisation mit Hilfe eines Taschenformers. Vollständig auspolymerisierte Gele wurden in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Anodenraum) gestellt. Der Kathodenraum wurde bis zur Höhe des Überlaufstutzens mit dem gleichen Puffer gefüllt. Die Gele wurden vor Beginn des Laufes bei 4°C für 12 h gelagert.

Das Sammelgel aus 3% Acrylamid und die Trenngele aus 10%, 7,5% oder 5% Acrylamid wurden aus einer Stammlösung von 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Folgende Puffer wurden eingesetzt: 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)/0,1% (w/v) SDS als Sammelgelpuffer; 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8)/0,1% (w/v) SDS als Trenngelpuffer; 0,025 M Tris/0,192 M Glycin/0,1% (w/v) SDS (pH 8,3) als Elektrodenpuffer. Die chemische Polymerisierung wurde mit 0,1% (v/v) TEMED und mit 1% (v/v) einer 10%igen (w/v) Ammoniumpersulfatlösung vorgenommen (110).

Die Proteinproben wurden in einem Auftragspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 7,5)/8 M Harnstoff/2% (w/v) SDS) 1:2 verdünnt. Zur Spaltung der Proteine in ihre Untereinheiten wurden diese in Gegenwart von 40 mM DTT bei 37°C für 30 min oder

bei 100°C für 5 min inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Zimmertemperatur erfolgte eine Inkubation mit Jodacetamid (20 mM) für 10 min bei 20°C (92). Die Behandlung der nicht-reduzierten Proben erfolgte unter identischen Versuchsbedingungen in Abwesenheit von DTT. Die Referenzproteine Phosphorylase a (Sigma), β -Galactosidase (Sigma), Carbonic Anhydrase (Sigma), Ovalbumin (Serva) und Rinderserumalbumin (Boehringer) wurden in einer Konzentration von je 2 mg/ml in H₂O dest. gelöst und dann unter reduzierenden Bedingungen im Auftragspuffer 1:2 verdünnt.

Die gelösten Proben wurden mit Saccharose beschwert, mit 0,01% (w/v) Bromphenolblau angefärbt und in die Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit 60 Volt konstanter Spannung gestartet. Wenn die Bande des Indikatorfarbstoffes die Grenzlinie zum Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht. Der Elektrophoreselauf wurde beendet, wenn der Indikatorfarbstoff das Ende des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde dann für 1 Stunde pro mm Gelstärke angefärbt. Die Färbelösung bestand aus 10 ml einer 1%igen Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg) und 400 ml eines Gemisches aus 60 g TCA, 800 ml H₂O, 200 ml Methanol und 70 ml Eisessig. Die Entfärbung der Gele erfolgte in einer Mischung aus Methanol (120 ml), Eisessig (20 ml) und H₂O dest. (280 ml) auf einer Laborwippe (Firma Köttermann). Die Gele wurden ausgewertet und anschließend getrocknet (Geltrockner Modell 224, Firma Bio Rad). Zur Dokumentation wurden die getrockneten Gele fotografiert.

10.2. Analytische Disk-PAGE

Die Disk-PAGE wurde ebenfalls mit der vertikalen Plattenelektrophorese durchgeführt. Das 5%ige Trenngel und das 3%ige Sammelgel wurden aus einer Polyacrylamidstammlösung (50% (w/v) Polyacrylamid/0,8% (w/v) Bis) hergestellt. Die Pufferlösungen waren 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, für das Sammelgel und 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, für das Trenngel.

Die chemische Polymerisation erfolgte nach Entgasen der Lösungen mit 0,1% (v/v) TEMED und 1% (v/v) einer 10%igen (w/v) Ammoniumpersulfatlösung. Der Elektrodenpuffer bestand aus 0,025 M Tris/0,192 M Glycin und wurde mit 1 N HCl auf pH 8,3 eingestellt (Handbuch zur PAGE, Pharmacia, Schweden).

In einigen Experimenten wurde ein Großporgel mit Agarose-zusatz verwendet. Hier lag die Trenngelkonzentration von Polyacrylamid und von Agarose bei 3% bzw. 0,5% (83).

Die Proteinlösungen wurden nach Äquilibrierung gegen den Sammelgelpuffer mit gemahlener Saccharose zu einer 10%igen Endkonzentration beschwert, mit wenigen Kristallen Bromphenolblau versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde mit 60 Volt im Sammelgel und 120 Volt konstanter Spannung im Trenngel durchgeführt. Mit Austritt des Indikatorfarbstoffes aus dem Gel wurde die Elektrophorese beendet. Die Färbung und Entfärbung der Gele erfolgte wie bei der SDS-PAGE. Zur Dokumentation wurden die Gele getrocknet und photographiert.

11. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde auf Objektträgern durchgeführt, die mit Agarose (2 ml einer 1%igen (w/v) Agaroselösung in Elektrophoresepuffer) beschichtet worden waren (111). Nach dem Erstarren wurden die Auftragslöcher für die Proben und der Antikörperkanal in das Gel eingestanzt. Mit einer Kapillare wurde das Gel aus den Auftragslöchern entfernt. Nach Einfüllen der Proben (maximal 20 µl pro Loch) wurden die Objektträger in die Elektrophoresekammer gelegt, welche mit Puffer gefüllt worden war (Tris/Barbiturat-Puffer, pH 8,8 für die Immunelektrophorese; Firma Camag, Muttensz/Schweiz). Die Stromverbindung zwischen Gel und Puffer wurde mit puffergetränkten Filterpapierstreifen hergestellt. Die Trennung erfolgte bei 4°C mit einer konstanten Spannung bei einer Feldstärke von 5 V/cm für 2 Stunden.

Nach der elektrophoretischen Trennung wurde der Antikörperkanal ausgehoben und mit dem jeweiligen Antiserum (100 µl) gefüllt. In einer feuchten Kammer bildeten sich nach 16 bis 24 Stunden die Immunpräzipitate im Gel aus. Zur Dokumentation wurden die Gele in einer 1%igen (w/v) NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und angefärbt. Nach differenzierter Entfärbung wurden die Objektträger dann photographiert und aufbewahrt. Färbelösung: Coomassie Brilliant Blue R 250 0,5%ig in 450 ml Äthanol, 100 ml Eisessig und 450 ml H₂O dest. (vor Gebrauch filtriert). Entfärbelösung: Methanol/Eisessig im Verhältnis 9:1.

12. Gewinnung der Antiseren

Die Antiseren gegen C3 und C5 wurden durch Immunisierung von Kaninchen (Firma Nikisch/Osthofen) gewonnen. Proteinlösungen (0,2 mg/ml) wurden im Verhältnis 1:1 mit kompletten Freund's Adjuvants (Difco) verdünnt. Nach drei Injektionen (i.m.) von je 0,1 mg Protein im Abstand von etwa 10 Tagen wurde Blut aus dem Ohr der Kaninchen entnommen. Nach Gerinnung wurde das Serum durch Zentrifugation von den anderen Blutbestandteilen getrennt.

13. Präparation von radioaktiv markierten ¹⁴C-C3, ¹⁴C-C5 und von ¹⁴C-C3b

Die Methylierung der gereinigten C-Komponenten wurde in Anlehnung an das von KREUTZER et. al. (112) beschriebene Verfahren zur radioaktiven Markierung von humanem C3 durchgeführt. C3 (1 mg/ml) in 25 mM KPO₄-Puffer, pH 7,5, wurde mit 50 µCi ¹⁴C-Formaldehyd (¹⁴CH₂O, 15 mCi/mmol) und 10 µl Cyano-borhydrid (6 mg/ml) bei 37°C für 15 min inkubiert. Zur Entfernung nicht fixierter Radioaktivität wurde dieses Reaktionsgemisch nach Ankonzentration in einer Kollodiumhülse (Firma Sartorius, Göttingen) über eine Sephacryl S 300 Säule (1,6 x 70 cm, äquilibriert gegen 25 mM KPO₄-Puffer, pH 7,5)

fraktioniert. Die spezifische Aktivität von ^{14}C -C3 lag durchschnittlich bei 2980 ± 185 dpm/ μg Protein. Der Verlust an hämolytischer Aktivität betrug nur 2-3%. ^{14}C -C3b wurde durch Trypsinspaltung aus dem markierten ^{14}C -C3 gewonnen (s. Abschnitt 6.)

Die radioaktive Markierung von C5 erfolgte in gleicher Weise. Mit einer spezifischen Aktivität von 4688 ± 370 dpm/ μg Protein war die radioaktive Markierung dieses Proteins deutlich effizienter als für C3. Ein signifikanter Verlust an hämolytischer Aktivität trat auch während der Präparation von ^{14}C -C5 nicht auf.

14. Bestimmung der Radioaktivität

Alle Radioaktivitätsbestimmungen erfolgten in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (ALSS MR 300 DPM, Firma Kontron, Schweiz) mit eingebautem Rechner und automatischer dpm-Auswertung. Die Proben (0,1-0,5 ml) wurden in Szintillationsröhrchen (Firma Zinsser, Frankfurt) gemessen, die jeweils mit 5 ml Szintillatorflüssigkeit (Supersolve, Firma Zinsser, Frankfurt) gefüllt worden waren.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung in Röhrchen mit Sucrosegradienten wurden diese direkt in die Szintillationsröhrchen ausgetropft, mit 5 ml Szintillatorlösung versehen und gemessen. Zur Bestimmung der Radioaktivität in Polyacrylamidgelen wurden diese in 5 mm große Stücke zerschnitten und die Proben wurden dann in Gegenwart von 30%igem H_2O_2 (0,5 ml) für 12 h bei 75°C in verschlossenen Szintillationsgefäßen solubilisiert. Nach dem Abkühlen auf 4°C wurde nach der Methode von GROWER und BRANSOME (113) Katalase (50 μl) hinzugegeben und anschließend mit 5 ml Szintillatorflüssigkeit aufgefüllt. In allen durchgeführten Messungen lagen die Zählausbeuten über 80%.

Zur Ermittlung der Zählausbeute und zur dpm-Berechnung mußte eine Quenchkorrekturkurve in den Rechner des Szintillations-

zählers eingegeben werden. Diese wurde erstellt, indem ein ^{14}C -Aktivitäts-Standard (^{14}C -markierte Palmitinsäure, 50700 dpm, Firma Kontron) in eine Reihe von Szintillationsröhrchen mit jeweils 5 ml Szintillatorlösung gegeben wurde. Verschiedene Mengen an CCl_4 (0-100 μl) als chemischer Quencher wurden hinzupipettiert. Mit der anschließenden Auszählung ergab sich eine Quenchkorrekturkurve, die in dem Szintillationszähler gespeichert wurde.

15. Ultrazentrifugation

15.1. Sedimentationsanalyse in diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten

Das Sedimentationsverhalten von C3 und Reaktionsgemischen aus LPS mit C3 wurde in diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten (90, 80, 70, 60, 40, 20, 10, 5 % Sucrose (w/v) in 10 mM KPO_4 -Puffer/150 mM NaCl, pH 7,0) in einer Beckmann-Spinco-Ultrazentrifuge (Modell 22-65 B, Rotor SW 40 bei 35000 UpM für 17 h, 4°C) analysiert. Es wurden Cellulose-Nitrat-Röhrchen (1,4 cm $\varnothing$, 9,5 cm Länge) mit je 12 ml Sucroselösung (1,5 ml pro Stufe) vorsichtig gefüllt. Nach Stabilisierung der Gradienten für 4 Stunden bei 4°C wurden 0,5 ml Reaktionsgemisch auf die Gradienten aufgetragen. Zur Auswertung wurden die Röhrchen nach der Zentrifugation von unten mit einer Hohlzahnspitze angestochen und Fraktionen (Fraktionssammler Redirac 2112, Firma LKB, Schweden) von je 5 Tropfen ($\hat{=}$ 0,3 ml) gewonnen. Die Radioaktivität und hämolytische Aktivität wurden wie beschrieben bestimmt.

15.2. Molekulargewichtsbestimmung in linearen Sucrose-Gradienten

Das Sedimentationsverhalten von Proteinen und LPS-C3-Komplexen in linearen Sucrose-Gradienten wurde in Anlehnung an die von MARTIN und AMES (77) beschriebene Methode unter-

sucht. Die Cellulose-Nitrat-Röhrchen wurden mit 12 ml der folgenden Lösungen gefüllt: 1) 2,5 - 20 % Sucrose (w/v) in 10 mM KPO_4 -Puffer/150 mM NaCl, pH 7,0, für die Untersuchung von Proteinen oder 2) 10 - 70 % Sucrose (w/v) in 10 mM KPO_4 -Puffer/150 mM NaCl, pH 7,0, für die Untersuchung von LPS-C3-Komplexen. Auf die Gradienten wurden 0,5 ml Proteinlösung mit 0,5 mg C3 und einem Referenzproteingemisch (Cytochrom c, Katalase, Aldolase und Humanalbumin; je 0,5 mg) oder mit 0,5 mg C5 und dem gleichen Referenzproteingemisch aufgetragen. Die Gewinnung der Fraktionen und die Bestimmung der Enzymaktivität oder Radioaktivität in den Fraktionen erfolgte wie oben beschrieben. Absorptionsmessungen für Protein wurden bei 280 nm und für Cytochrom c bei 400 nm durchgeführt.

Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte nach der von SCHACHMAN (78) aufgestellten Formel:

$$\frac{S_1}{S_2} = \left(\frac{\text{MG}_1}{\text{MG}_2} \right)^{\frac{2}{3}} \quad \hat{=} \quad \lg \text{MG}_1 = \lg \text{MG}_2 + \frac{3}{2} (\lg S_1 - \lg S_2)$$

S = Sedimentationskonstante ($S_{20,W}$)

MG = Molekulargewicht

1 $\hat{=}$ unbekanntes Protein

2 $\hat{=}$ Standard

16. Molekulargewichtsbestimmung mit Sephacryl S 300

Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe einer Gelfiltration wurde von ANDREWS (80, 114) beschrieben. Eine Chromatographiesäule (2,6 x 100 cm) wurde mit Sephacryl S 300 zu einem Bettvolumen von 570 ml gefüllt. Das Gel war gegen 25 mM KPO_4 -Puffer/150 mM NaCl, pH 7,5, äquilibriert worden. Der Puffer über dem Säulenbett wurde vorsichtig mit 3 ml Proteinlösung unterschichtet, die je 5 mg C3 oder C5, Ferritin, Katalase, Aldolase, Rinderserumalbumin und Cytochrom c enthielt. Durch Impulssteuerung mit einer Schlauch-

pumpe (Varioperplex 2120, Firma LKB, Brommer/Schweden) in Verbindung mit dem Fraktionssammler (Ultrorac II) von der gleichen Firma wurde ein konstantes Fraktionsvolumen (2,45 - 2,52 ml) mit einer Durchflußrate von 10 ml/h aufrecht- erhalten. Die Aktivität der Referenzenzyme und der Komple- mentkomponenten wurde wie beschrieben bestimmt. Ferritin und Cytochrom c wurden auf Grund ihrer Absorbtion bei 400 bzw. 415 nm in den Fraktionen lokalisiert. Nur die Fraktion mit maximaler Aktivität wurde für die Berechnung des Elutions- volumens herangezogen.

17. Bestimmung der Enzymaktivitäten von Katalase und Aldolase

Die Messungen wurden mit dem Gilford Photometer (Modell 250) durchgeführt und über einen TE-Wandler mit angeschlossenem Kompensationsschreiber aufgezeichnet. Die Standard-Tests wurden in 1 oder 3 ml Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Aktivität wurde im Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Enzymmenge ermittelt und als $\Delta E/\text{min}$ darge- stellt. Reaktionsansätze für die Messung der Katalase bei 240 nm (115):

Wasserstoffperoxid (30%ig)	0,16 ml
0,050 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0	ad 100 ml
Von diesem Gemisch	2,9 - 2,99 ml
Probe	0,01- 0,1 ml
Endvolumen	3 ml

Reaktionsansatz für die Messung der Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase bei 366 nm (Boehringer Informationen):

50 mM TEA-Puffer pH 7,6	2,78 ml
15 mM NADH ₂	0,05 ml
50 mM Fructose-1,6-Diphosphat	0,05 ml
GDH/TIM (2 mg/ml)	0,02 ml
Probe	0,10 ml
	3,0 ml

18. Elektronenmikroskopie

LPS und Reaktionsgemische von LPS mit C3 wurden in VBS⁻⁻⁻-Puffer (5 mM Veronal/HCl/150 mM NaCl, pH 7,3) auf LPS-Konzentrationen von 20 - 160 µg/ml verdünnt. In Anlehnung an die von VALENTINE et. al. (116) beschriebene Methode der Negativkontrastierung wurden die Präparate angefertigt. Nach Adsorption (1-2 min) der Probe an Kohlefilter erfolgte die Kontrastierung in Uranylacetat (1%ig, pH 5) für 2 min. Der auf der Negativ-Kontrastierungs-Lösung schwimmende Kohlefilm wurde dann auf ein beschichtetes Kupfernetzchen aufgetupft und auf Filterpapier getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop im Institut für Mikrobiologie, Erlangen, angefertigt. Die elektronenoptischen Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Burkhard, Institut für Mikrobiologie, Erlangen, durchgeführt.

19. Chemikalien

Es wurden handelsübliche p.a. Chemikalien der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. Spezielle Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft: Sephacryl S 300, DEAE-Sephacel, SP-Sephadex C 50, QAE-Sephadex A 50 und Lysin-Sepharose 4 B von der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden;

HA-Klarget von der Firma LKB, Brommer, Schweden; ^{14}C -Formaldehyd 15 mCi/mmol von Radiochemical Centre, Amersham via Firma Buchler, Braunschweig. Acrylamid, Bis, TEMED, Ammoniumpersulfat, Coomassie Brilliant Blue R 250, entionisierter Harnstoff sowie Ovalbumin von der Firma Serva, Heidelberg. Die Eichproteine Phosphorylase a, Carbonic Anhydrase und β -Galactosidase von der Firma Sigma, München; Rinderserumalbumin (BSA) von der Firma Boehringer, Mannheim. Die Cordis-Komplementkomponenten C2, C3, C6, C7, C8 und C9 von der Firma Dr. Madaus Diagnostika, Köln. Die gereinigte Komplementkomponente C1 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. M. Loos (Mainz) zur Verfügung gestellt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BITTER-SUERMAN, D. 1983 Das Komplementsystem:
Physiologische Funktion und
klinische Bedeutung.
Deutsches Ärzteblatt 80, 33
2. BRADE, V. 1979 Komplement. Funktion, biolo-
gische Bedeutung und
klinische Aspekte.
Münch. med. Wschr. 121, 1521
3. MAYER, M. M. 1973 The complement system.
A foreign cell in the body
is identified by antibody,
but the cell is destroyed by
other agents. Among them is
"complement" an intricately
linked set of enzymes.
Scientific American 229, 54
4. VOGT, W. 1982 Aktivierung und biologische
Wirkungen des Komplement-
systems.
Funkt. Biol. Med. 1, 189
5. WEIGLE, W. O. 1983 Regulation of immune response
GOODMAN, M. G. by components of the comple-
MORGAN, E. L. ment cascade and their
HUGLI, T. E. activated fragments.
Springer Semin. Immunopathol.
6, 173
6. MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1975 Complement.
Ann. Rev. Biochem. 44, 697

7. AUSTEN, K.F. 1968 Terminology:
Nomenclature of complement.
Bull. W.H.O. 39, 935
8. ALPER, C. A. 1981 Nomenclature of the alter-
native activating pathway
of complement.
Bull. W.H.O. 59, 489
9. HARTUNG, H. P. 1983 Synthesis of complement by
HADDING, U. macrophages and modulation
of their functions through
complement activation,
Springer Semin. Immunopathol.
6, 283
10. BRADE, V. 1980 Synthesis and release of
BENTLEY, C. complement components by
macrophages,
In: Mononuclear Phagocytes .
Functional Aspects .
(Ed. R. van Furth)
Martinus Nijhoff Publishers
S. 1385
11. COLTEN, H. R. 1976 Biosynthesis of complement .
Adv. Immunol. 22, 67
12. VOGT, W. 1983 Activation of the complement
system .
Agents und Actions 13, 391
13. REID, K. B. M. 1981 The proteolytic activation
PORTER, R. R. systems of complement,
Ann. Rev. Biochem. 50, 433

14. ZICCARDI, R. J. 1983 The first component of human complement (C1): Activation and control. Springer Semin. Immunopathol. 6, 213
15. LOOS, M. 1983 Biosynthesis of the collagen-like C1q molecule and its receptor functions for Fc and polyanionic molecules of macrophages. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 102, 1
16. BAUER, J. 1981 Conformational changes of the subunits C1q, C1r and C1s of human complement component C1 demonstrated by ¹²⁵J-labelling. Biochem. Biophys. Acta 670, 129
17. MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1967 Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and fourth components of human complement. J. Exp. Med. 125, 359
18. CAMPBELL, R. D. 1980 The binding of human complement component C4 to antigen-antibody aggregates. Biochem. J. 189, 67
- DODDS, A. W.
 PORTER, R. R.

19. NAGASOWA, S. 1977 Cleavage of C2 by C1 $\bar{s}$ into
STROUD, R. M. the antigenetically distinct
fragments of C2a and C2b:
Demonstration of binding of
C2b to C4b.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74, 2998
20. KERR, M. A. 1980 The human complement system:
Assembly of the classical
pathway C3 convertase.
Biochem. J. 189, 173
21. STROUD, R. M. 1965 Catalysis of C'2 fixation
AUSTEN, K. F. by C'1a.
MAYER, M. M. Reaction kinetics, compete-
tive inhibition by TAME and
transferase hypothesis of
the enzymatic action of C'1a
on C'2, one of its natural
substrates.
Immunochem. 2, 219
22. LAW, S. K. 1979 Evidence for an ester
LICHTENBERG, N. A. linkage between the labile
LEVINE, R. P. binding site of C3b and
receptive surfaces.
J. Immunol. 123, 1388
23. LAW, S. K. 1977 Interaction between the
LEVINE, R. P. third complement protein
and cell surface.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74, 2701

24. SIM, R. B. 1981 The covalent-binding
TUROSE, T. M. reaction of complement
PATERSON, D. S. component C3.
SIM, E. Biochem. J. 193, 115
25. DAVIES, S. G. 1981 Intramolecular general acid
SIM, R. B. catalysis in the binding
reactions of α_2 -macroglu-
bin and complement components
of C3 and C4.
Bioscience Rep. 1, 461
26. KHAN, S. A. 1981 Synthesis of macrocyclic
ERICKSON, B. W. peptide thiolactones as
models of the metastable
binding sites of α_2 -macro-
globulin and complement
protein C3b.
J. Americ. Chem. Soc. 103,
7374
27. LAW, S. K. 1980 Covalent binding and hemo-
LICHTENBERG, N. A. lytic activity of comple-
LEVINE, R. P. ment proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
77, 2117
28. VOGT, W. 1978 A new function of the acti-
SCHMIDT, G. vated third component of
VON BUTTLAR, B. complement: Binding to C5,
DIEMINGER, A. an essential step for C5
activation.
Immunology 34, 29

29. GÖTZE, O. 1976 The alternative pathway
MÜLLER-EBERHARD, H.J. of complement activation.
Adv. Immunol. 24, 1
30. BRADE, V. 1978 The properdin system:
Composition and function.
Vox Sanguinis 35, 1
31. MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1980 Molecular biology and
SCHREIBER, R. D. chemistry of the alternative
pathway of complement.
Adv. Immunol. 29, 1
32. PANGBURN, M. K. 1981 Formation of the initial
SCHREIBER, R. D. C3 convertase of the alter-
MÜLLER-EBERHARD, H.J. native complement pathway.
J. Exp. Med. 154, 856
33. PANGBURN, M. K. 1977 Human complement C3b in-
SCHREIBER, R. D. activator: isolation,
MÜLLER-EBERHARD, H.J. characterization and the
demonstration of an absolute
requirement for the serum
protein B1H for cleavage of
C3b and C4b in solution.
J. Exp. Med. 146, 257
34. PANGBURN, M. K. 1980 Activation of the alternative
NORRISON, D. C. complement pathway: Recog-
SCHREIBER, R. D. nition of surface structures
MÜLLER-EBERHARD, H.J. on activators by bound C3b.
J. Immunol. 124, 977

- | | | |
|---|------|---|
| 35. VOGT, W. | 1977 | Multiple functions of the activated third component of complement C3b, in complement-dependent reactions. Behring Inst. Mitt. <u>61</u> , 50 |
| 36. DAHA, M. R.
FEARON, D. T.
AUSTEN, K. F. | 1976 | C3 requirements for formation of alternative pathway C5 convertase. J. Immunol. <u>117</u> , 630 |
| 37. DI SCIPIO, R. G. | 1981 | The conversion of human complement component C5 into fragment C5b by the alternative-pathway C5 convertase. Biochem. J. <u>199</u> , 497 |
| 38. DI SCIPIO, R. G. | 1981 | The binding of human complement proteins C5, factor B, B ₁ H and properdin to complement fragment C3b on zymosan. Biochem. J. <u>199</u> , 485 |
| 39. LAW, S. K.
FEARON, D. T.
LEVINE, R. P. | 1979 | Action of the C3b-inactivator on cell-bound C3b. J. Immunol. <u>122</u> , 759 |
| 40. SIM, E.
WOOD, B.
HSIUNG, L.
SIM, R. B. | 1981 | Pattern of degradation of human complement fragment, C3b. FEBS. Letters <u>132</u> , 55 |
| 41. MAYER, M. M. | 1981 | Membrane damage by complement. Johns Hopkins Med. J. <u>148</u> , 243 |

42. PODACK, E. R. 1980 Membrane attack complex of complement.
MÜLLER-EBERHARD, H.J. Evidence for its dimeric structure based on hybrid formation.
J. Biol. Chem. 256, 3145
43. TSCHOPP, J. 1981 Membranolysis by the ninth component of human complement.
PODACK, E. R. Biochem. Biophys. Res. Comm. 100, 1409
44. LI, C. K. N. 1980 Molecular transport via the functional complement lesions.
LEVINE, R. P. Molec. Immunol. 17, 1465
45. TAYLOR, P. W. 1983 Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria.
Microbiol. Rev. 47, 46
46. HUGLI, T. E. 1978 Anaphylatoxins: C3a and C5a.
MÜLLER-EBERHARD, H.J. Adv. Immun. 26, 1
47. FEARON, D. T. 1983 Complement ligand-receptor interactions that mediate biological responses.
WONG, W. W. Ann. Rev. Immunol. 1, 243

48. BRADE, V. 1980 Die Sekretion von Mediatoren der Entzündung und der antimikrobiellen Abwehr durch Makrophagen.
Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A 247, 259
49. DAMERAU, B. 1978 Chemotactic effects of the complement-derived peptides C3a and C5a (classical anaphylatoxin) on rabbit and guinea-pig polymorphnuclear leucocytes.
Naumyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 305, 184
50. ROSS, G. D. 1980 Analysis of the different types of leucocyte membrane complement receptors and their interaction with the complement system.
J. Immunol. Meth. 37, 197
51. PANGBURN, M. K. 1983 C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface.
J. Immunol. 131, 1930
52. MEDOF, M. E. 1982 Unique role of the complement receptor CR₁ in the degradation of C3b associated with immune complexes.
J. Exp. Med. 156, 1739
- GRÜNEFELD, E.
VOGT, W.
- SCHREIBER, R. D.
MÜLLER-EBERHARD, H.J.
- IIDA, K.
MOLD, C.
NUSSENZWEIG, V.

53. NIKAIDO, H. 1973 Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide and the outer membrane layer of gram-negative cell wall.
In: Bacterial Membranes and Walls, Vol. 1,
(Ed. L. Leive); Marcel Dekker Inc. New York S. 131
54. NIKAIDO, H. 1976 Outer membrane of Salmonella typhimurium. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances.
Biochem. Biophys. Acta 433, 118
55. WESTPHAL, O. 1952 Über die Extraktion von
LÜDERITZ, O. Bakterien mit Phenol/Wasser.
BISTER, F. Z. Naturforsch. 7b, 148
56. GALANOS, CH. 1969 A new method for the extrac-
LÜDERITZ, O. tion of R lipopolysaccharides
WESTPHAL, O. Europ. J. Biochem. 2, 245
57. LÜDERITZ, O. 1971 Isolation and chemical and
WESTPHAL, O. immunological characteriza-
STAUB, A. M. tion of bacterial lipopoly-
NIKAIIDO, H. saccharides.
In: Microbial Toxins, Vol. 4,
(Eds. G. Weinbaum, S. Kadis
and S. J. Ajl.) Academic
Press, New York S. 145

58. GALANOS, CH. 1977 Biological activities and immunological properties of Lipid A.
FREUDENBERG, M.
HASE, S.
JAY, F.
RUSCHMANN, E.
In: Microbiology - 1977, (Ed. D. Schlessinger), American Society for Microbiology, Washington D.C., S. 269
59. SPINK, W. W. 1964 The initial stage of canine endotoxin shock as an expression of anaphylactic shock: Studies on complement titers and plasma histamine concentrations.
DAVIS, R. B.
POTTER, R.
CHARTRAND, S.
J. Clin. Invest. 43, 696
60. PILLEMER, L. 1955 The properdin system and immunity
SCHOENBERG, M. D.
BLUM, L.
WURZ, L.
II. Interaction of the properdin system with polysaccharides.
Science 122, 545
61. GEWURZ, H. 1968 Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide: Consumption of each of the six terminal complement components.
SHIN, H. S.
MERGENHAGEN, S. E.
J. Exp. Med. 128, 1049

62. MARCUS, R. L. 1971 An alternative complement
SHIN, H. S. pathway: C3-cleaving activity
MAYER, M. M. not due to C4, C2a on endo-
toxic lipopolysaccharide
after treatment with guinea-
pig serum; relation to pro-
perdin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
68, 1351
63. GÖTZE, O. 1971 The C3 activator system:
MÜLLER-EBERHARD, H.J. An alternative pathway of
complement activation.
J. Exp. Med. 134, 905
64. DIERICH, M. P. 1973 Analysis of bypass activation
BITTER-SUERMAN, D. of C3 by endotoxic LPS and
KÖNIG, W. loss of this potency.
HADDING, U. Immunology 24, 721
GALANOS, CH.
RIETSCHER, E. TH.
65. GALANOS, CH. 1971 Interaction of lipopoly-
RIETSCHER, E. TH. saccharides and lipid A with
LÜDERITZ, O. complement.
WESTPHAL, O. Eur. J. Biochem. 19, 143
66. FINE, D. P. 1974 Activation of the classic
and alternative complement
pathways by endotoxin.
J. Immunol. 112, 763

67. SNYDERMAN, R. 1975 Interaction of complex polysaccharides with the complement system. Effect of calcium depletion on terminal component consumption. Infect. Immun. 11, 273
68. MORRISON, D. C. 1977 Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS) J. Immunol. 118, 362
69. LOOS, M. 1974 Interaction of the first (C1) the second (C2) and the fourth (C4) component of complement with different preparations of bacterial lipopolysaccharides and with lipid A. J. Immunol. 112, 935
70. BRADE, V. 1979 Interaction of lipopolysaccharides and of lipid A from *Yersinia enterocolitica* with purified guinea pig C3. Immunobiol. 156, 441
71. TACK, B. F. 1976 Third component of human complement: Purification and physicochemical characterization. Biochemistry 15, 4513
- PRAHL, J. W.

79. CARNEGIE, P. R. 1965 A peptide-mapping technique
for the estimation of mole-
cular size.
Nature 206, 1128
80. ANDREWS, P. 1965 The gel-filtration behavior
of proteins related to their
molecular weights over a
wide range.
Biochem. J. 96, 595
81. GALANOS, CH. 1975 Electrodialysis of lipopoly-
saccharides and their con-
version to uniform salt
forms.
Eur. J. Biochem. 54, 603
82. GALANOS, CH. 1976 The role of the physical
state of lipopolysaccharides
in the interaction with
complement.
Eur. J. Biochem. 65, 403
83. PEACOCK, A. C. 1968 Molecular weight estimation
and separation of ribonucleic
acid by electrophoresis in
agarose-acrylamide composite
gels.
Biochemistry 7, 668
84. SHIN, H. S. 1968 The third component of the
guinea pig complement system.
I. Purification and charac-
terization.
Biochemistry 7, 2991

85. BITTER-SUERMAN, D. 1970 Independent and consecutive action of C5, C6 and C7 in immune hemolysis.
HADDING, U.
MELCHERT, F.
WELLENSIEK, H. J. I. Preparation of EAC 1-5 with purified guinea pig C3 and C5.
Immunochemistry 7, 955
86. COOK, C. T. 1971 The fifth component of guinea pig complement system.
SHIN, H. S. I. Purification and characterization.
MAYER, M. M. J. Immun. 106, 467
LAUDENSLAYER, K. A.
87. MEUER, S. 1978 The anaphylatoxic peptide C3a of guinea pig complement.
BECKER, S. I. Purification, physico-chemical and antigenetic properties.
HADDING, U. Z. Immun. Forsch. 154, 135
BITTER-SUERMAN, D.
88. KINOSHITA, T. 1981 Fifth component of guinea pig complement: Purification and characterization
HONG, K. J. Immunol. 126, 2414
KONDO, K.
INOUE, K.
89. HAMMER, C. H. 1981 Large scale isolation of functionally active components of the human complement system.
WIRTZ, G. H. J. Biol. Chem. 256, 3995
RENFER, L.
GRESHAM, H. D.
TACK, B. F.
90. MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1968 Chemistry and reaction mechanism of complement.
Advan. Immunol. 8, 1

91. THOMAS, M. L. 1983 Identification and Alignment
TACK, B. F. of a thiol ester site in the
third component of guinea
pig complement.
Biochemistry 22, 942
92. SIM, R. B. 1981 Autolytic fragmentation of
SIM, E. complement components C3 and
C4 under denaturing condi-
tions; a propertie shared
with α_2 -macroglobulin.
Biochem. J. 193, 129
93. KÖNIG, W. 1971 Physicochemical characteri-
BITTER-SUERMAN, D. zation of the fifth (C5),
DIERICH, M. sixth (C6), seventh (C7),
HADDING, U. eighth (C8) and ninth (C9)
component of guinea pig
complement.
Eur. J. Immunol. 1, 372
94. NILSSON, U. R. 1972 Additional studies on human
TOMAR, R. H. C5: Development of an modi-
TAYLOR, F. B. fied purification method and
characterization of the puri-
fied product by polyacryl-
amid gel electrophoresis.
Immunochem. 2, 709
95. MÜLLER-EBERHARD, H.J. 1960 Relation of a B_1 -glycoprotein
NILSSON, U. R. of human serum to the comple-
ment system.
J. Exp. Med. 111, 217

96. SHANDS, J. W. 1971 The physical structure of bacterial lipopoly-saccharides.
In: Microbial Toxins ,
Vol. IV. (Ed. G. Weinbaum,
S. Kadis and S. J. Ajl.)
Academic Press, New York
and London, S. 127
97. SKARNES, R. C. 1971 Host-dependent detoxification
ROSEN, F. S. of bacterial endotoxin.
In: Microbial Toxins, Vol. V
(Ed. S. Kadis, G. Weinbaum
and S. J. Ajl)
Academic Press, New York
and London, S. 151
98. BADER, J. 1973 Action of polymyxin B on
TEUBER, M. bacterial membranes.
I. Binding to the O-anti-
genic lipopolysaccharide of
Salmonella typhimurium.
Z. Naturforsch. 28 c, 422
99. LAW, S. A. 1981 Binding reaction between the
MINICH, T. M. third human complement pro-
LEVINE, R. P. tein and small molecules.
Biochemistry 20, 7457
100. NE'EVAN, Z. 1971 Characterization of the
KAHANE, I. mycoplasma membrane proteins.
RAZIN, S. II. Solubilization and
enzymatic activities of
Acholeplasma laidlawii
membrane proteins.
Biochem. Biophys. Acta 249,16

101. CAPEL, P. J. 1978 The binding of activated C3 to polysaccharides and immunoglobulins. J. Immunol. 121, 2566
102. BJÖRNDAL, H. 1967 Gas liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. Acta. chem. scand. 21, 1801
103. WARTENBERG, K. 1975 On the sugar content of the lipopolysaccharides of the various strains known as Yersinia enterocolitica. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 230, 361
104. JENSEN, M. 1980 Strukturanalyse der Lipoid A Komponente von Lipopolysacchariden aus Yersinia enterocolitica. Doktorarbeit, Universität Freiburg
105. RAPP, H. J. 1970 Reagents commonly used in complement research. In: Molecular basis of complement action, (Ed. H. J. Rapp), Appleton-Century Crofts, New York S. 75
106. KABAT, E. A. 1961 Experimental immunochemistry. 2. Ausg., S. 133 (Charles C. Thomas, Publ.), Springfield, Ill.

107. BRADE, V. 1984 Formation of EAC $\overline{142}$ and
BEUSCHER, H. U. EAC $\overline{1423}$ with macrophage
culture supernatant con-
taining the secreted comple-
ment components C1 to C3.
Immunobiology, im Druck
108. MINTA, J. O. 1977 Kinetic studies on the
MAN, D. fragmentation of the third
MOVAT, H. Z. component of complement (C3)
by trypsin.
J. Immunol. 118, 2192
109. LOWRY, O. H. 1951 Protein measurement with the
ROSEBROUGH, N. J. folin phenol reagent
FARR, A. L. J. Biol. Chem. 193, 265
RANDALL, R. J.
110. LAEMMLI, U. K. 1970 Cleavage of structural
proteins during the assembly
of the head of bacteriophage
T $_4$.
Nature 227, 680
111. SCHNEIDEGGER, J. J. 1955 Une micro-méthode de
l'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy Appl.
Immunol. 7, 103
112. KREUTZER, D. L. 1979 Preservation of C3, C5 and
KUNKEL, S. C5a functional activities by
WARD, P. A. a new radiolabelling method;
SHOWELL, H. demonstration of C5 products
MC LEAN, R. H. in complement-activated
serum.
J. Immunol. 123, 2278

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Brade für die Überlassung des Themas, für die vielen wertvollen Anregungen, konstruktiven Diskussionen und die stets gewährte Hilfe bei der Bewältigung experimenteller und theoretischer Probleme. Ferner bedanke ich mich für seine Bemühungen um meine weitere Fortbildung im Anschluß an die vorliegende Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Knapp danke ich vor allem für die freundliche Aufnahme am Institut und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Röllinghoff danke ich für sein Interesse und seine Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. K. Wartenberg für die vielen Ratschläge und gute Zusammenarbeit sowie für die Überlassung von verschiedenen Lipopolysaccharid-Präparationen.

Bei Fräulein S. Haux, Fräulein I. Kleber und Frau U. Stephan möchte ich mich für ihre freundliche technische Hilfe bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv. Doz. Dr. H. J. Burkhardt für die freundliche Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

LEBENS LAUF

26.06.1954 Geburt in Göttingen / Niedersachsen
Vater : Adam Beuscher
Mutter: Grete Beuscher, geb. Siegmann

April 1961 -
April 1965 Besuch der Grundschule in Göttingen

April 1965 -
Juni 1973 Besuch des Felix-Klein-Gymnasiums in
Göttingen

22.05.1973 Reifeprüfung

Juli 1973 -
Juni 1975 Ableistung des Wehrdienstes

01.04.1975 Immatrikulation an der Georg-August-
Universität Göttingen für das Fach
Landwirtschaft

15.10.1975 Wechsel zum Studienfach Biologie

19.10.1977 Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie,
Botanik, Chemie und Physikalische Chemie

04.12.1980 Diplom in den Fächern Mikrobiologie,
Biochemie und Organische Chemie

Die Diplomarbeit trug den Titel:
"Charakterisierung eines strikt anaeroben,
nichtsporenbildenden, harnsäureverwertenden
Bakteriums"

01.02.1981 Wechsel an die Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen-Nürnberg und Beginn
der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

